THESE présentée

pour l'obtention

du

DIPLOME DE DOCTEUR DE 3E CYCLE

à

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

- Paris 6 -

Spécialité : BIOCHIMIE

Mention : STRUCTURE ET FONCTION DES PROTEINES

par M. Bernard BARBIER

Sujet de la Thèse :

LE REPRESSEUR DE L'OPERON LACTOSE D'*E. COLI*. ETUDE DE LA FIXATION NON SPECIFIQUE PAR PONTAGE PHOTOCHIMIQUE.

Soutenue le 20 Décembre 1982 devant la Commission composée de :

M.	ACHER Roger	Président
M.	FAVRE Alain	Examinateur
M.	MONSIGNY Michel	"
M.	CHARLIER Michel	"

UNIV.
NORTH
DAK.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543515_0021

THESE présentée

pour l'obtention

du

DIPLOME DE DOCTEUR DE 3E CYCLE

à

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

- Paris 6 -

Spécialité : BIOCHIMIE

Mention : STRUCTURE ET FONCTION DES PROTEINES

par M. Bernard BARBIER

Sujet de la Thèse :

LE REPRESSEUR DE L'OPERON LACTOSE D'*E. COLI*. ETUDE DE LA FIXATION NON SPECIFIQUE PAR PONTAGE PHOTOCHIMIQUE.

Soutenue le 20 Décembre 1982 devant la Commission composée de :

M.	ACHER Roger	Président
M.	FAVRE Alain	Examinateur
M.	MONSIGNY Michel	"
M.	CHARLIER Michel	"

A Kim-Dung,

Sandrine

et tous mes proches

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Centre de Biophysique Moléculaire du C.N.R.S., à ORLEANS.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur C. HELENE, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle et Directeur de Recherche au C.N.R.S., qui a bien voulu m'accueillir dans ce laboratoire.

Messieurs les Professeurs R. ACHER et A. FAVRE ont accepté de juger ce travail, je leur exprime ici tous mes remerciements.

Monsieur le Professeur M. MONSIGNY m'a fait profiter de ses connaissances pour la mise au point des expériences d'analyse d'acides aminés et a accepté de faire partie de ce jury. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance.

Je voudrais exprimer plus particulièrement ma profonde gratitude à Monsieur M. CHARLIER, Maître de Recherche au C.N.R.S., qui m'a initié à la recherche et a dirigé ce travail. J'ai été très heureux de profiter de sa culture et de ses qualités scientifiques. Son amitié, ses conseils, son aide et ses critiques m'ont permis de mener à bien cette étude. Qu'il trouve en ces quelques lignes l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur J.C. MAURIZOT, Maître de Recherche au C.N.R.S. m'a accueilli dans son équipe et a su tout au long de ces travaux me faire profiter de ses connaissances scientifiques, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur D. THIERRY, Ingénieur au B.R.G.M. a bien voulu me faire bénéficier de sa compétance en informatique, je l'en remercie vivement.

Je remercie vivement Madame M.L. WELTER pour son aide technique dans la réalisation des expériences d'analyse des acides aminés.

Monsieur A. GERVAIS a bien voulu préparer les quantités importantes de répresseur nécessaires à cette étude, que son travail, sa gentillesse et son amitié trouvent ici mon vif remerciement.

Je tiens à remercier également Mesdames F. CULARD, F. TOULME, et M. GRANGER-SCHNARR ainsi que Messieurs M. SCHNARR, J. PILET et M. DURAND dont j'ai apprécié l'amitié, les conseils et les critiques au cours de ces deux années passées en leur compagnie.

J'adresse également tous mes remerciements à Madame M. PELLE et à Mademoiselle G. SERROS qui ont permis la réalisation de ce mémoire.

Enfin, j'associe à ces remerciements tous les membres du Centre de Biophysique Moléculaire qui m'ont accordé leur sympathie et qui ont su entretenir une atmosphère de travail propice à la réalisation de cette étude.

TABLE DES MATIERES

I - INTERACTIONS ACIDES NUCLEIQUES-PROTEINES : LE REPRESSEUR DE L'OPERON LACTOSE 1

A) INTERACTIONS ACIDES NUCLEIQUES-PROTEINES 1

B) LE SYSTEME REPRESSEUR-OPERATEUR DE L'OPERON LACTOSE 2

1) L'opéron lactose 2

2) L'opérateur lac. 4

3) Le répresseur 5

C) PRESENTATION DU TRAVAIL 8

II - MATERIEL ET METHODES 10

A) PREPARATION DU REPRESSEUR 10

1) Culture et extraction 10

2) Caractérisation du répresseur 10

B) PREPARATION DE L'ADN BrU 11

1) Culture et extraction 11

2) Caractérisation de l'ADN BrU 12

C) PREPARATION DU PEPTIDE N-TERMINAL OU "PEPTIDE HP" 13

D) PREPARATION DES COMPLEXES 13

E) METHODES 14

1) Spectrophotométrie d'absorption 14

2) Fluorescence 15

3) Dichroïsme cicualire 15

4) Pontages photochimiques 15

5) Electrophorèse 16

6) Ultracentrifugation 16

7) Hydrolyses enzymatiques 19

8) Analyse d'acides aminés 20

III - ETUDE DU COMPLEXE PONTE ADN BrU-REPRESSEUR 21

A) PONTAGE PHOTOCHIMIQUE ADN BrU-REPRESSEUR 21

B) INFLUENCE DES LONGUEURS D'ONDES D'IRRADIATION 27

C) CINETIQUE DE PONTAGE EN FONCTION DE LA FLUENCE 29

IV - ETUDE DU NOMBRE DE SITES DE FIXATION LORS DES INTERACTIONS NON SPECIFIQUES 34
A) PRINCIPE DE L'EXPERIENCE 34
B) PROTOCOLE EXPERIMENTAL 34
C) RESULTATS 37

V - DETERMINATION DE LA REGION PONTEE PHOTOCHIMIQUEMENT
A) INTRODUCTION ET PRINCIPE
B) HYDROLYSE TRYPSIQUE DU COMPLEXE PONTE
1) Hydrolyse limitante
2) Hydrolyse non limitante
C) HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DU COMPLEXE PONTE

VI - PONTAGE PHOTOCHIMIQUE DE LA REGION N-TERMINALE DU REPRESSEUR AVEC L'ADN BrU
A) INTRODUCTION
B) RESULTATS
1) Préparation du complexe
2) Mise en évidence du complexe
3) Expérience de pontage photochimique
4) Conclusion

VII - EVALUATION DU NOMBRE DE PROTOMERES EN CONTACT AVEC L'ADN LORS DES INTERACTIONS NON-SPECIFIQUES
A) PRINCIPE
B) METHODOLOGIE
C) RESULTATS
1) Hydrolyse chymotrypsique
2) Hydrolyse trypsique
D) CONCLUSION

VIII - ANALYSE DU PEPTIDE PONTE PHOTOCHIMIQUEMENT
A) INTRODUCTION 62
B) METHODOLOGIE 62
C) RESULTATS ET DISCUSSION 65

IX - CONCLUSION GENERALE 73

BIBLIOGRAPHIE 77

LISTE DES ABREVIATIONS

CAP : Catabolite gene activator protein

IPTG : Isopropyl-β-D-thiogalactoside

DTE : Dithio-1,4-erythritol

ONPF : O-nitrophenyl-β-D-fucoside

PMSF : Phenylmethanesulfonyl fluoride

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

TPCK : L-1-p-tosylamino-2-phenylethyl chloromethyl ketone

TLCK : Nα-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride

SDS : Sodium dodecyl sulfate

p.b. : Paires de bases

Rep. : Represseur de l'opéron lactose

Tris : Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane

KPi x M : Tampon KH_2PO_4, K_2HPO_4 x M, DTE 10^{-4} M

I - INTERACTIONS ACIDES NUCLEIQUES-PROTEINES : LE REPRESSEUR DE L'OPERON LACTOSE

A) INTERACTIONS ACIDES NUCLEIQUES-PROTEINES

La reconnaissance mutuelle des acides nucleiques et des proteines et leurs interactions jouent un rôle fondamental dans les cellules vivantes (voir revue récente : HELENE et LANCELOT, 1982). Ce rôle tient à l'extrême diversité et à l'importance des mécanismes biologiques concernés : on peut citer notamment les systèmes de réplication (ADN polymérases, ligases ...), de transcription (CRP, ARN polymérases, répresseurs ...), d'association structurale (histones, certaines proteines ribosomales ...) ou de traduction ... etc.

Pour mieux comprendre ces intéractions intermoléculaires, il est préférable de les étudier en fonction de leur spécificité plutôt que de leur rôle biologique : la DNase I et EcoRI qui sont deux endonucléases possèdent un mécanisme d'action totalement différent lié à leur spécificité différente.

On a pu noter la spécificité de certaines proteines vis-à-vis d'une séquence de bases dans une double hélice (répresseur de l'opéron lactose, proteine Cro, ARN polymérase + σ , EcoRI, CRP ...), vis-à-vis d'une base (ADN et ARN polymérases, ARN réplicase), vis-à-vis d'une structure (ADN déroulase, P32 de T4, Qβ réplicase), vis-à-vis de tout à la fois (tARN ligase) ou même avec une spécificité très large ou sans spécificité apparente (histones, certaines proteines ribosomales, DNase I, hydrolases). ces spécificités peuvent elles-même être modifiées par la présence d'effecteurs comme des sucres, des ions métalliques, des nucléotides, des peptides ou même des proteines.

Ces observations démontrent à la fois la complexité et la variété des mécanismes d'interaction entre les acides nucleiques et les proteines (intéractions hydrophobes, électrostatiques, empilements et liaisons hydrogènes). Tous ces mécanismes mettent en évidence l'importance des structures tertiaires des acides nucleiques (structure en double hélice, conformation locale au niveau des bases, ... etc) et des proteines et rejettent l'hypothèse d'une reconnaissance dépendant de leur seule structure primaire.

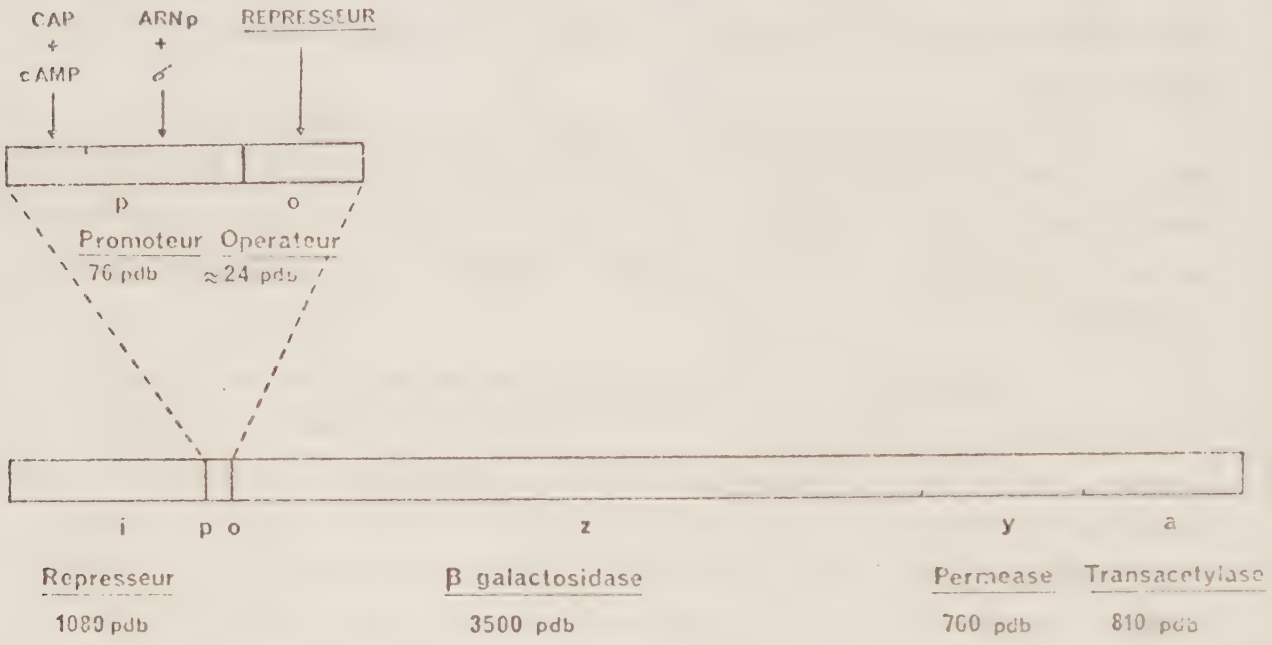
Pour tenter d'expliquer tous ces mécanismes, un grand nombre de systèmes ont été étudiés, et parmis eux, tout particulièrement celui qui permet la régulation de l'opéron lactose.

B) LE SYSTEME REPRESSEUR-OPERATEUR DE L'OPERON LACTOSE

1) L'opéron lactose

C'est pour ce système que JACOB et MONOD présentèrent en 1961 un modèle de régulation de la synthèse des enzymes responsables du catabolisme du lactose chez E. coli.

Carte génétique de l'opéron lactose



Le represseur synthétisé à partir du gène i bloque la transcription de l'ADN (contrôle négatif de l'induction) en se fixant sur la région opérateur du système (K_a = 10^{11} M^{-1} à 10^{13} M^{-1}).

Dans ce système, l'inducteur, qui est in vivo l'allolactose, se fixe sur le répresseur et diminue la constante d'association de celui-ci pour l'opérateur, et permet la transcription des différents gènes de structure de l'opéron lactose (z, y, a).

Le répresseur possède également une affinité importante pour des sites pseudo-opérateurs ayant des séquences proches de celle de l'opérateur (PFAHL et col., 1979):

. Le "deuxième opérateur" dans le gène z

. Le "troisième opérateur" à la fin du gène i (DICKSON et col., 1975)

Enfin, le répresseur peut également se fixer sur des ADN non-opérateur, ces intéractions ne différant essentiellement des liaisons spécifiques que par leur absence de sensibilité aux inducteurs (LIN et RIGGS, 1974) et par leur indépendance vis-à-vis de la composition en bases à faible et moyenne force ionique (REVZIN et VON HIPPEL, 1977; WANG et col., 1977).

Après les travaux de RIGGS et col. (1970a, 1970b) qui montraient que la vitesse de l'association entre le répresseur et l'opérateur ne pouvait s'expliquer par la seule diffusion directe de la protéine vers l'opérateur, de nouveaux mécanismes ont été proposés, faisant tous intervenir les séquences non spécifiques. Ces séquences non-opérateur, qui constituent la presque totalité de l'ADN d'E. coli, joueraient donc, malgré une constante d'association plus faible ($K_a = 10^6\ M^{-1}$ à $10^8\ M^{-1}$), un rôle important dans les mécanismes de contrôle biologique et de régulation (LIN et RIGGS, 1972b; VON HIPPEL et col., 1974).

LIN et RIGGS (1972a) ont ainsi envisagé un mécanisme en deux étapes faisant intervenir une fixation momentanée du répresseur sur l'ADN et sa diffusion vers la région opérateur. Parmis les divers mécanismes de diffusion qui interviendraient, nous pouvons citer notamment les transferts interchaînes, les sauts sur une même chaîne (phénomènes de dissociation-réassociation du complexe ADN-répresseur), et un glissement unidimentionnel du répresseur le long de la double hélice d'ADN qui serait le mécanisme prédominant de la diffusion du répresseur vers la séquence opérateur (BERG et col., 1981; WINTER et VON HIPPEL, 1981; WINTER et col., 1981).

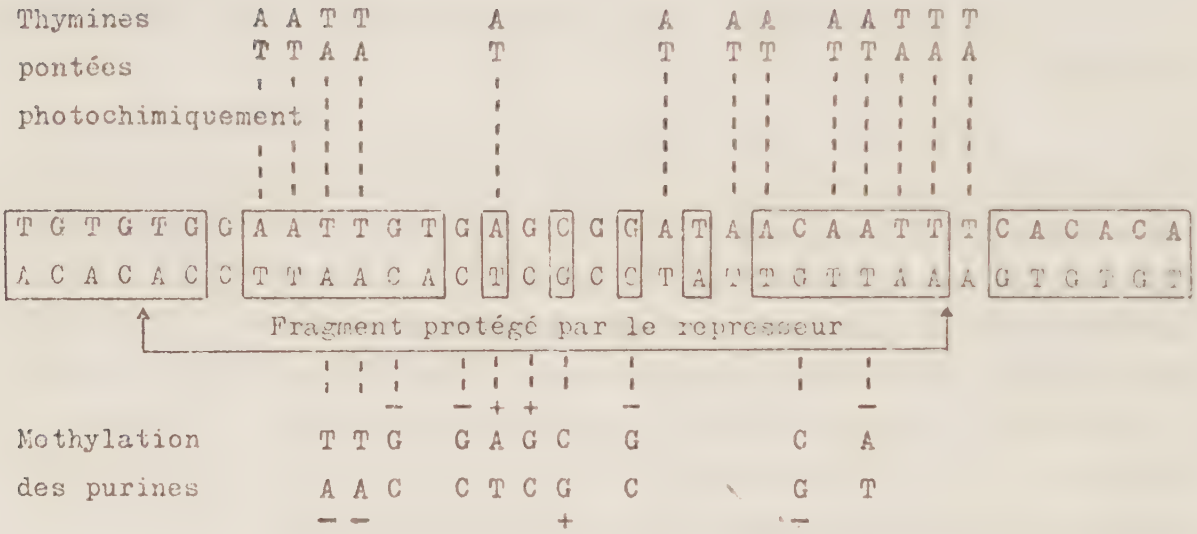
In vivo, ces séquences pourraient également servir de compétiteur en présence des inducteurs, les intéractions non spécifiques n'étant pas affaiblies lors de la fixation d'un inducteur sur le répresseur.

L'ensemble des travaux effectués sur les mécanismes de régulation du système de l'opéron lactose semble ainsi démontrer le rôle prépondérant que ces séquences jouent dans les mécanismes de contrôle biologique et de régulation, et justifient les études approfondies dont font l'objet ces intéractions non spécifiques.

Après les travaux de GILBERT et MAXAM qui ont séquencé l'opérateur en 1973, BEYREUTHER et col. (1973, 1975) et FARABAUGH (1978) ont pu déterminer la structure primaire du represseur.

La complémentarité des études génétiques et biochimiques a permis de préciser les régions du represseur (MULLER-HILL, 1975; MILLER et col., 1975; WEBER et col., 1975) et de l'opérateur (GILBERT et col., 1975) qui sont en interaction.

2) L'opérateur lac



- Au milieu : Sequence opérateur de l'opéron Lactose (GILBERT et MAXAM, 1973)
- En haut : Thymines auquelles le represseur se ponte photochimiquement lors de l'irradiation UV du complexe represseur-Opérateur substitué à la 5 BrdUrd (OGATA et GILBERT, 1977)
- En bas : Positions où le represseur inhibe (-) ou favorise (+) la methylation des purines par le dimethyl sulfate (GILBERT et col., 1976)

3) Le répresseur

Le répresseur de l'opéron lactose est une protéine tétramérique constituée de sous-unités identiques de masse moléculaire 37 160. Le protomère comprend 360 acides aminés et sa structure primaire est connue depuis les travaux de BEYREUTHER et col. (1973, 1975) et de FARABAUGH (1978)(cf figure I 1).

L'hydrolyse trypsique ménagée du répresseur dans certaines conditions restrictives (FILES et WEBER, 1976; GEISLER et WEBER, 1978) permet l'isolement de deux régions.

. 1 région téramérique résistante à la trypsine : "corps"
Séquence 60 - 340

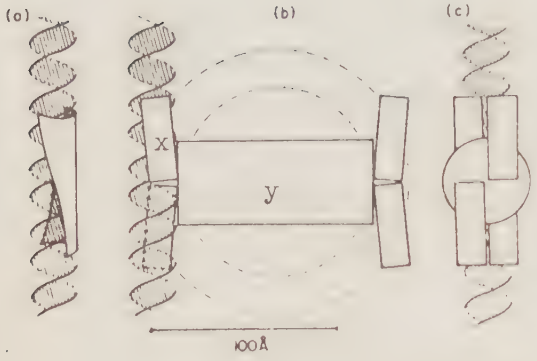
. 4 peptides N-terminaux par tétramère : 4 "peptides HP"
Hydrolyse complète ⟶ "peptide HP" court : séquence 1 - 51
Hydrolyse incomplète ⟶ "peptide HP" long : séquence 1 - 59

La même hydrolyse dans des conditions non restrictives provoque l'hydrolyse complète des "peptides HP" ainsi que la trypsinolyse des 4 peptides C terminaux de chaque protomère (domaine 341 - 360). Ces protéolyses ne provoquent pas la dissociation du "corps" tétramérique, elles démontrent ainsi que la zone d'intéraction entre les protomères se situe dans la région 60 - 340. Cependant, l'arrangement entre les sous-unités demeure encore inconnu.

De nombreuses expériences ont pu montrer que les régions N-terminales étaient impliquées dans les mécanismes d'intéraction avec l'opérateur ou avec des ADN non-opérateurs (MULLER-HILL, 1975; MILLER et col., 1975; WEBER et col., 1975; LIN et RIGGS, 1975; ADLER et col., 1972; PLATT et col., 1973). La démonstration que les "peptides HP" libres se complexent avec l'opérateur et des ADN non-opérateurs (GEISLER et WEBER, 1977; OGATA et GILBERT, 1978; BUCK et col., 1980 et CULARD et col., 1983) a confirmé l'importance de ce domaine dans les mécanismes d'intéraction ADN-répresseur.

Cependant, si MATTHEWS (1979) et O'GORMAN et col. (1980) ont observé la fixation du "corps" trypsique sur l'opérateur ($K_a = 10^7\ M^{-1}$), d'autres auteurs parmi lesquels PLATT et col. (1973), FILES et WEBER (1976), FRIED et CROTHERS (1981) et CULARD (communication personnelle) n'ont pu le mettre en évidence. Sur la base de ces résultats et de certains travaux qui seront décrits dans les autres chapitres, divers modèles de répresseurs ont été proposés (cf page 6).

MODELES DE REPRESSEUR, INTERACTIONS AVEC L'ADN



Modèle extrait de l'article de CHARLIER et col. (1981).

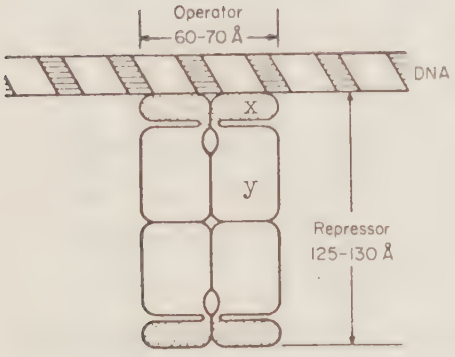
(a) : Représentation de la surface de contact entre le répresseur et l'ADN.

(b) : Vue latérale du complxe

(c) : Vue frontale du complexe

x : "peptide HP"

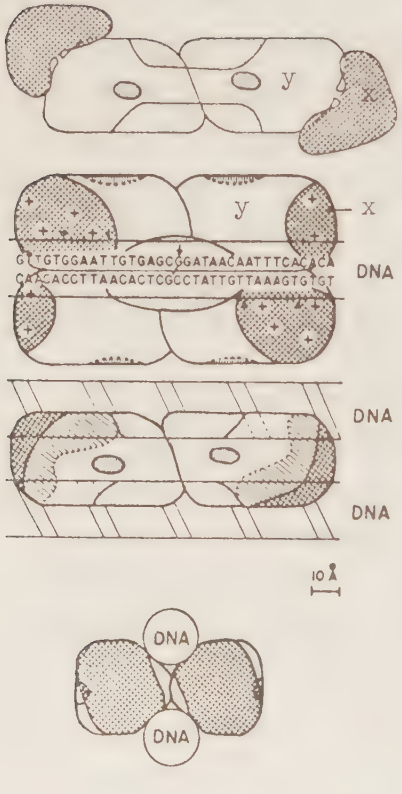
y : "corps" tétramérique



Modèle extrait de l'article de Mc KAY et col. (1982).

x : "peptide HP"

y : "corps"



Modèle extrait de l'article de DUNAWAY et col. (1980).

x : "peptide HP"

y : "corps"

\+ : Intéractions ioniques de la région N terminale.

Figure I_1 : Séquence du represseur de l'opéron lactose d'après BEYREUTHER et col. (1973, 1975) et FARABAUGH (1978).

Met Lys Pro Val Thr Leu Tyr Asp Val Ala Glu Tyr Ala Gly Val
10
Ser Tyr Gln Thr Val Ser Arg Val Val Asn Gln Ala Ser His Val
20 30
Ser Ala Lys Thr Arg Glu Lys Val Glu Ala Ala Met Ala Glu Leu
40
Asn Tyr Ile Pro Asn Arg¦Val Ala Gln Gln Leu‡Ala Gly Lys¦Gln
50 60
Ser Leu Leu Ile Gly Val Ala Thr Ser Ser Leu Ala Leu His Ala
70
Pro Ser Gln Ile Val Ala Ala Ile Lys Ser Arg Ala Asp Gln Leu
80 90
Gly Ala Ser Val Val Val Ser Met Val Glu Arg Ser Gly Val Glu
100
Ala Cys Lys Ala Ala Val His Asn Leu Leu Ala Gln Arg Val Ser
110 120
Gly Leu Ile Ile Asn Tyr Pro Leu Asp Asp Gln Asp Ala Ile Ala
130
Val Glu Ala Ala Cys Thr Asn Val Pro Ala Leu Phe Leu Asp Val
140 150
Ser Asp Gln Thr Pro Ile Asn Ser Ile Ile Phe Ser His Glu Asp
160
Gly Thr Arg Leu Gly Val Glu His Leu Val Ala Leu Gly His Gln
170 180
Gln Ile Ala Leu Leu Ala Gly Pro Leu Ser Ser Val Ser Ala Arg
190
Leu Arg Leu Ala Gly Trp His Lys Tyr Leu Thr Arg Asn Gln Ile
200 210
Gln Pro Ile Ala Glu Arg Glu Gly Asp Trp Ser Ala Met Ser Gly
220
Phe Gln Gln Thr Met Gln Met Leu Asn Glu Gly Ile Val Pro Thr
230 240
Ala Met Leu Val Ala Asn Asp Gln Met Ala Leu Gly Ala Met Arg
250
Ala Ile Thr Glu Ser Gly Leu Arg Val Gly Ala Asp Ile Ser Val
260 270
Val Gly Tyr Asp Asp Thr Glu Asp Ser Ser Cys Tyr Ile Pro Pro
280
Leu Thr Thr Ile Lys Gln Asp Phe Arg Leu Leu Gly Gln Thr Ser
290 300
Val Asp Arg Leu Leu Gln Leu Ser Gln Gly Gln Ala Val Lys Gly
310
Asn Gln Leu Leu Pro Val Ser Leu Val Lys Arg Lys Thr Thr Leu
320 330
Ala Pro Asn Thr Gln Thr Ala Ser Pro Arg¦Ala Leu Ala Asp Ser
340
Leu Met Gln Leu Ala Arg Gln Val Ser Arg Leu Glu Ser Gly Gln
350 360

¦ : sites d'hydrolyse trypsique ménagée

‡ : sites d'hydrolyse chymotrypsique ménagée

C) PRESENTATION DU TRAVAIL

Parmi les techniques d'études employées lors de l'étude des protéines, l'une des méthodes présentant le plus d'intérêts est la diffraction des rayons X sur les cristaux, mais l'incapacité d'obtenir plus que des microcristaux de répresseur (STEITZ et col., 1974), a limité la connaissance de sa structure tertiaire.

Pour contourner ces difficultés, en plus des résultats obtenus par la génétique, les études biochimiques et biophysiques ont été particulièrement développées.

Parmi les diverses orientations données aux travaux, l'identification des acides aminés et des bases de l'ADN étant en intéraction nous a paru présenter un intérêt particulier.

Des substitutions chimiques comme la méthylation des purines effectuée sur un complexe répresseur-opérateur (GILBERT et col., 1976), ou des pontages photochimiques entre le répresseur et l'opérateur substitué à la 5-BrdUrd (OGATA et GILBERT, 1977) ont permis l'identification de certains points de contact importants entre l'opérateur et le répresseur (cf page 4). Cependant, des études analogues entreprises sur le répresseur n'ont pas permis de préciser les résultats obtenus à l'aide de méthodes génétiques par MULLER-HILL (1975) et ADLER et col.(1972). C'est en utilisant les pontages photochimiques que nous allons poursuivre ces études.

Depuis les travaux de SMITH (1962) et de ALEXANDER et MOROSON (1962), nous savons qu'il est possible d'induire un pontage photochimique entre les protéines et les acides nucléiques. Lors de l'irradiation de complexes entre protéines et acides nucléiques, des liaisons covalentes peuvent s'établir entre les chaînes latérales de certains acides aminés (ou les liaisons peptidiques) et les bases des acides nucléiques.

L'application de cette méthode sur différents systèmes a permis l'identification de nucléotides ou d'oligonucléotides (BUDZIK et col., 1975; SCHOEMAKER et col., 1975; MOELLER et col., 1978; SCHIMMEL, 1979; EHRESMANN, 1980) ou d'acides aminés et peptides (EHRESMANN et col., 1975; HAVRON et SPERLING, 1977; MOELLER et col., 1978, MALY et col., 1980; TSE et col., 1980) engagés dans les liaisons covalentes induites par un pontage photochimique.

Cependant, cette technique de couplage oblige à irradier le complexe dans la zone d'absorption de l'ADN ou de la proteine, ce qui provoque la formation d'un nombre important de photoproduits.

Une partie de ces problèmes a pu être évitée par l'utilisation de dérivés photosensibles. La substitution des thymines par des 5-Bromo-2'-désoxyuridines permet d'accroître la sensibilité aux radiations U.V. des composés substitués (SETLOW et SETLOW, 1972; HUTCHINSON, 1973). La sensibilité aux U.V. de l'ADN substitué est ainsi proportionnelle à la quantité de 5-Bromodésoxyuracile (GREER, 1960). En outre, le Bromouracile absorbe à des longueurs d'ondes plus élevées que les autres bases et permet des excitations à des longueurs d'ondes supérieures à 300 nm, ce qui permet une moindre dégradation des acides nucleiques et des proteines.

L'utilisation d'ADN ainsi substitués a permis le pontage photochimique du répresseur avec des séquences spécifiques et non spécifiques (OGATA et GILBERT, 1977; LIN et RIGGS, 1974). Si les thymines de la séquence opérateur auquelles le répresseur peut se ponter photochimiquement ont été identifiées par OGATA et GILBERT (1974),(cf page 4), aucun renseignement n'a pu être apporté par cette méthode sur les résidus du répresseur impliqués dans le pontage photochimique.

En utilisant les techniques et les résultats décrits ci-dessus, nous allons tenter de ponter photochimiquement le répresseur à des ADN non-opérateur substitués à la 5-BrdUrd. Nous espérons ainsi apporter des informations sur les interactions non spécifiques ADN-répresseur et sur la nature des pontages. En fonction des résultats obtenus, nous espérons pouvoir identifier le peptide du répresseur impliqué dans les interactions non spécifiques.

II - MATERIEL ET METHODES

A) PREPARATION DU REPRESSEUR

1) Culture et extraction

Le répresseur a été préparé au laboratoire à partir de la souche BMH 493 d'E. coli (don de B. MULLER-HILL) par A. GERVAIS.

L'obtention de grandes quantités de répresseur (jusqu'à 1% de la masse protéique de la bactérie) est obtenue par amplification du gène i porté par un phage transducteur du gène lac., inductible thermiquement, et muté sur son promoteur (MULLER-HILL et col., 1968).

Le répresseur a été préparé par la méthode de ROSENBERG et col. (1977) modifiée par CULARD et MAURIZOT (1981).

Après la lyse des bactéries et la digestion des acides nucléiques, les débris sont éliminés par centrifugation. Suivent alors une précipitation au sulfate d'ammonium à 33 %, redissolution du précipité puis purification sur colonne de phosphocellulose (élution en gradient de force ionique 0,05 M - 0,25 M phosphate de potassium pH 7,25, le répresseur étant élué à 0,16 M - 0,19 M phosphate de potassium), la dernière étape est un tamisage moléculaire sur colonne d'ULTROGEL AcA 34. Tous les tampons contiennent du PMSF (40 mg/l) pour inhiber les protéases présentes dans les extraits cellulaires. Le répresseur est identifié à toutes les étapes par son affinité pour l'Isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG).

Le répresseur est ensuite stocké dans du tampon Tris-HCl, pH 8, 30 % glycérol à -20°C. Il se conserve ainsi plusieurs années.

2) Caractérisation du répresseur

La vérification de l'état de pureté du répresseur se fait par électrophorèse en présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS).

Pour contrôler l'activité du répresseur, plusieurs types d'expériences sont effectuées. Le répresseur possède en effet deux activités distinctes, l'une étant son aptitude à fixer les ligands, l'autre son affinité pour les ADN en général et l'opérateur en particulier.

La première de ces activités est contrôlée en montrant son aptitude à fixer l'IPTG. L'expérience est réalisée par équilibre de dialyse avec de l'IPTG ^{14}C selon le protocole décrit par GILBERT et MULLER-HILL (1966). Le contrôle peut également être fait par fluorescence : la fixation de l'IPTG

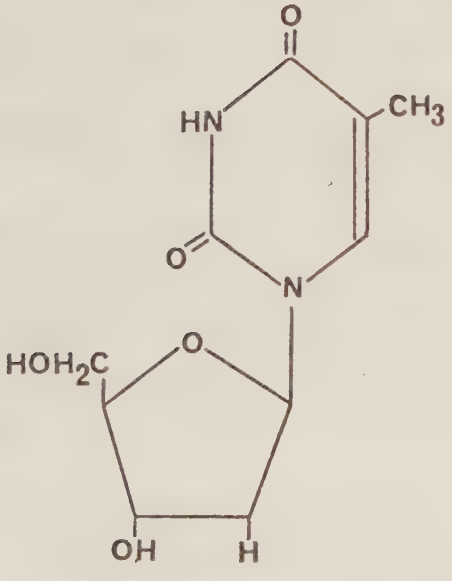
sur le répresseur déplace son spectre de fluorescence de 8 nm vers les courtes longueurs d'ondes (LAIKEN et col., 1972).

La fixation non spécifique sur l'ADN est quant à elle mesurée par dichroîsme circulaire (MAURIZOT et col., 1974)(cf courbe III 3). La fixation spécifique sur l'opérateur intégré dans un phage λ peut être contôlée par filtration sur filtre de nitrocellulose (BOURGEOIS, 1971), et sa fixation spécifique sur des fragments de 29 paires de bases portant la séquence opérateur vérifiée par dichroîsme circulaire ou électrophorèse (CULARD et MAURIZOT, 1981; CULARD, communication personnelle).

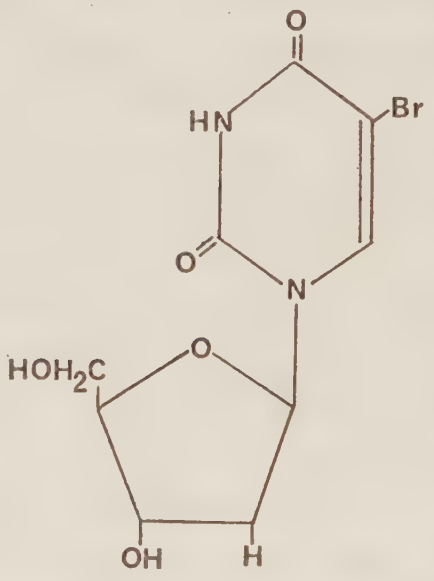
B) PREPARATION DE L'ADN BrU

1) Culture et extraction

Cette préparation consiste à substituer la 5-Bromo-2'-désoxy-uridine (5-BrdUrd) à son analogue la 2'-désoxythymidine (dThd) sur l'ADN d'une souche d'E. coli Thymidine$^-$ (WEYGAND et col., 1951, 1956).



2' désoxythymidine (dThd)



5 Bromo-2'-désoxyuridine (5-BrdUrd)

Les bactéries (souche B/r T^-) sont cultivées dans un milieu minimum (M_9) supplémenté en hydrolysat acide de caséine (0,25 %), glucose (0,4%), $MgSO_4$ (0,01 %) et en dThd pour la préculture ou en 5-BrdUrd (4 µg/ml) pour la culture.

Les bactéries sont lysées dans un tampon Tris-Hcl pH 8,0, 0,01 M, EDTA 0,05 M; NaCl 0,2 M en présence de SDS (0,125 %) et de proteinase K (50 µg/ml). Quand la solution est claire, elle est ajustée à 1 M en chlorure de sodium et les protéines sont extraites en présence d'un égal volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, V/V). Après 30 minutes d'agitation, la phase aqueuse est recueillie par centrifugation (20 mn à 15 000 g). L'ADN est alors précipité à l'éthanol froid (2 volumes d'éthanol/1 volume de solution) puis redissout dans un tampon citrate de sodium 15 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0 (SSC). On effectue alors un traitement à la RNase A (50 µg/ml) et T_1 (50 u/ml) suivi d'une nouvelle précipitation à l'éthanol après ajustement de la concentration en NaCl à 1 M. L'extraction finale des protéines résiduelles se fait alors par plusieurs traitements au phénol jusqu'à leur totale extraction. La solution d'ADN est alors dialysée pour extraire tout le phénol contre du tampon SSC, puis l'ADN est précipité à l'éthanol et sèché, il est alors conservé à l'abri de l'humidité à -20°C.

2) Caractérisation de l'ADN BrU

L'état de pureté de l'ADN BrU peut être vérifié par dichroïsme circulaire. On peut ainsi contrôler la présence de protéines résiduelles à 220 nm ou d'ARN à 260 nm.

Nous avons également vérifié la pureté de la préparation en effectuant une dénaturation thermique de l'ADN. Une éventuelle présence d'ARN résiduel se serait traduite, à l'inverse de l'ADN, par une augmentation graduelle et lente de l'hyperchromicité dans la plage de température précédant la fusion.

Pour déterminer le pourcentage de substitution en 5-BRdUrd, nous avons procédé par ultracentrifugation analytique, la technique et les résultats sont développés dans le paragraphe II 6.

Enfin, nous avons également vérifié que l'ADN BrU ainsi préparé n'émettait aucune fluorescence dans les conditions expérimentales de l'étude : λ_{Exc} = 280 ou 290 nm et 300 nm < λ_{Em} < 450 nm pour l'étude du répresseur et λ_{Exc} = 270 ou 275 nm et 290 nm < λ_{Em} < 450 nm pour l'étude du domaine N-terminal du répresseur.

C) PREPARATION DU PEPTIDE N TERMINAL OU "PEPTIDE HP"

Le "peptide HP" trypsique amino-terminal a été préparé selon le procédé décrit par GEISLER et WEBER (1977, 1978) par M. CHARLIER. La protéolyse su répresseur a été effectuée par de la trypsine traitée au TPCK avec une concentration de 1 % en masse par rapport au répresseur.

L'hydrolyse effectuée dans du tampon Tris-HCl 1 M, pH 7,5, glycerol 30 % et 0,01 M en mercaptoethanol est arrêtée au bout de deux heures par addition de l'inhibiteur trypsique de soja (excès 5 fois, m/m).

Les "peptides HP" sont séparés du "corps" trypsique sur colonne de sephadex G 150 équilibrée en $NH_4 HCO_3$ 0,1 M. Après lyophilisation, les "peptides HP" sont remis en solution dans le même tampon et purifiés par passage sur colonne de sephadex G 75 équilibrée dans le même tampon. Cette dernière étape permet, outre l'élimination du tampon Tris-glycerol d'hydrolyse, l'élimination du peptide résiduel 51 - 59. Ce protocole expérimental permet l'obtention du "peptide HP" court (1 - 51) (OGATA et GILBERT, 1979).

La pureté du "peptide HP" est confirmée par électrophorèse en présence de SDS et son activité vis-à-vis de l'opérateur ou d'ADN non spécifiques est vérifiée par dichroïsme circulaire. Sa masse a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par diffusion des neutrons (CHARLIER, communication personnelle).

D) PREPARATION DES COMPLEXES

Pour toutes les expériences, les concentrations des solutions mères de répresseur et d'ADN BrU sont déterminées par spectrophotométrie d'absorption (cf paragraphe II E 1). L'analyse du peptide ponté photochimiquement, l'expérience de double pontage et les cinétiques d'hydrolyse décrites dans le chapitre VII ont été faites en utilisant les proportions d'ADN et de répresseur suivantes :

1 répresseur / 25 paires de bases ADN BrU

(Rep) (p.d.b.)

- ADN : 3×10^{-4} M p.d.b.
- Rep : $1{,}2 \times 10^{-5}$ M en tétramères

Pour les autres expériences, des concentrations en répresseur et en ADN plus faibles ont été utilisées :

1 répresseur / 40 p.d.b. { ADN : 10^{-4} M en p.d.b. ; Rep : $2,5 \times 10^{-6}$ M en tétramères

Nous savons que le complexe ADN-répresseur ne se forme qu'à des forces ioniques où le répresseur libre est insoluble (< 0,1 M tampon phosphate de potassium pH 7,3) et que sa durée de vie diminue quand la concentration en sels augmente (REVZIN et VON HIPPEL, 1977; De HASETH et col., 1977; DURAND et MAURIZOT, 1980; BARKLEY, 1981). L'ADN et le répresseur sont donc mélangés dans du tampon phosphate de potassium 0,2 M, pH 7,3 où ils sont tous les deux solubles, et le complexe est formé en dialysant la solution contre du tampon phosphate de potassium 10^{-3} M, pH 7,3 en présence de dithioerythritol (DTE) 10^{-4} M. Par commodité, nous utiliserons désormais l'abréviation KPD x M pour désigner ce tampon.

On s'assure de la formation du complexe par dichroïsme circulaire (cf figure III 1). La fixation du répresseur sur l'ADN BrU provoque un changement de conformation de celui-ci qui se traduit par une augmentation de l'intensité dichroïque de l'ADN proportionnelle à la quantité de répresseur complexé et dont le maximum se situe aux environs de 273 nm.

Nous nous sommes également assuré de la formation du complexe par tamisage moléculaire sur Sepharose 6B qui permet l'exclusion de masses moléculaires élevées (4×10^6). Ainsi, à forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M), le complexe étant dissocié, le répresseur est retenu tandis que l'ADN est élué dans le volume exclu. En revanche, pour un complexe élué à faible force ionique (KPD 10^{-3} M), le répresseur complexé à l'ADN est élué en même temps que celui-ci.

E) METHODES

1) Spectrophotométrie d'absorption

Toutes les mesures d'absorbance et les spectres d'absorption ont été effectués sur un spectrophotomètre Beckman DU 8. Les concentrations en répresseur, "peptide HP" et ADN ont été calculées en utilisant les coefficients d'extinction molaire suivants :

ε_{280} répresseur = 21 400 M^{-1} cm^{-1} par protomère (CHARLIER et col., 1977)

ε_{275} "peptide HP" = 5 600 M^{-1} cm^{-1}

ε_{280} "peptide HP" = 4 800 M^{-1} cm^{-1} (JOVIN et col., 1977)

ε_{260} ADN BrU = 6 500 M^{-1} cm^{-1} par phosphate (HACKETT et HANAWALT, 1966)

2) Fluorescence

Toutes les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un spectrofluorimètre Jobin-Yvon modifié au laboratoire (BRUN et col., 1975). Les longueurs d'onde d'excitation pour l'étude des complexes avec le "peptide HP" et le répresseur ont été respectivement de 275 nm et 290 nm.

Lors des mesures de fluorescence de represseur complexé ou ponté à l'ADN, les spectres ont été corrigés pour tenir compte de la lumière absorbée par le substrat aux longueurs d'onde d'excitation (HELENE et col., 1971).

$$IF = IF_o \frac{d}{d_o} \frac{1 - 10^{-d_o}}{1 - 10^{-d}}$$

d = absorption totale de la solution à la longueur d'onde d'excitation

d_o = absorption du represseur à la longueur d'onde d'excitation ("peptide HP")

IF_o = intensité mesurée

IF = intensité corrigée

3) Dichroïsme circulaire

Les spectres dichroïques ont été enregistrés sur un dichrographe Jobin-Yvon Mark III.

Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant un porte-cuve thermostaté aux températures d'expérience.

Les résultats sont exprimés en intensité dichroïque $\Delta\varepsilon$:

$$\Delta\varepsilon = \frac{d \times s}{l \times c}$$

d = hauteur du spectre en mm mesurée sur l'appareil

s = sensibilité de l'appareil

l = trajet optique de la cuve (cm)

c = concentration de l'échantillon (M)

Pour le represseur et la "headpiece", les résultats sont exprimés en éllipticité θ

$$\theta = \Delta\varepsilon \times 3\,300$$

4) Pontages photochimiques

Ils ont été réalisés en irradiant avec une lampe au mercure de 200 watts (OSRAM HBO 200) montée dans un boîtier WILD. Entre la lampe et la

cuve contenant la solution, est placée une cuve en quartz remplie d'eau distillée dans le but d'arrêter la quasi totalité du rayonnement infrarouge susceptible d'être absorbé par l'eau (cf schéma page 17).

Divers filtres ont été utilisés :

. Nous avons utilisé pour toutes les irradiations un filtre à bande large (MTO 325 a) permettant d'arrêter le reste du rayonnement infrarouge (cf spectre de transmission page 18) pour éviter l'échauffement de la solution irradiée.

. Deux autres filtres passe bas (J 310 a, J 324 a) ont été utilisés séparément en fonction des expériences à réaliser (cf spectres de transmission page 18).

Ceci nous a permis d'irradier sélectivement la 5-BrdUrd (WEINTRAUB, 1973; WANG, 1976) en évitant une trop grande dégradation photochimique du répresseur et notamment des acides aminés photosensibles tels que le tryptophane ou la tyrosine (CHARLIER et col., 1977).

Toutes les irradiations ont été effectuées à 10°C.

Au début et à la fin de chaque irradiation, une mesure de la fluence est effectuée à l'aide d'une thermopile pour tenir compte d'éventuelles fluctuations de la lampe.

5) Electrophorèse

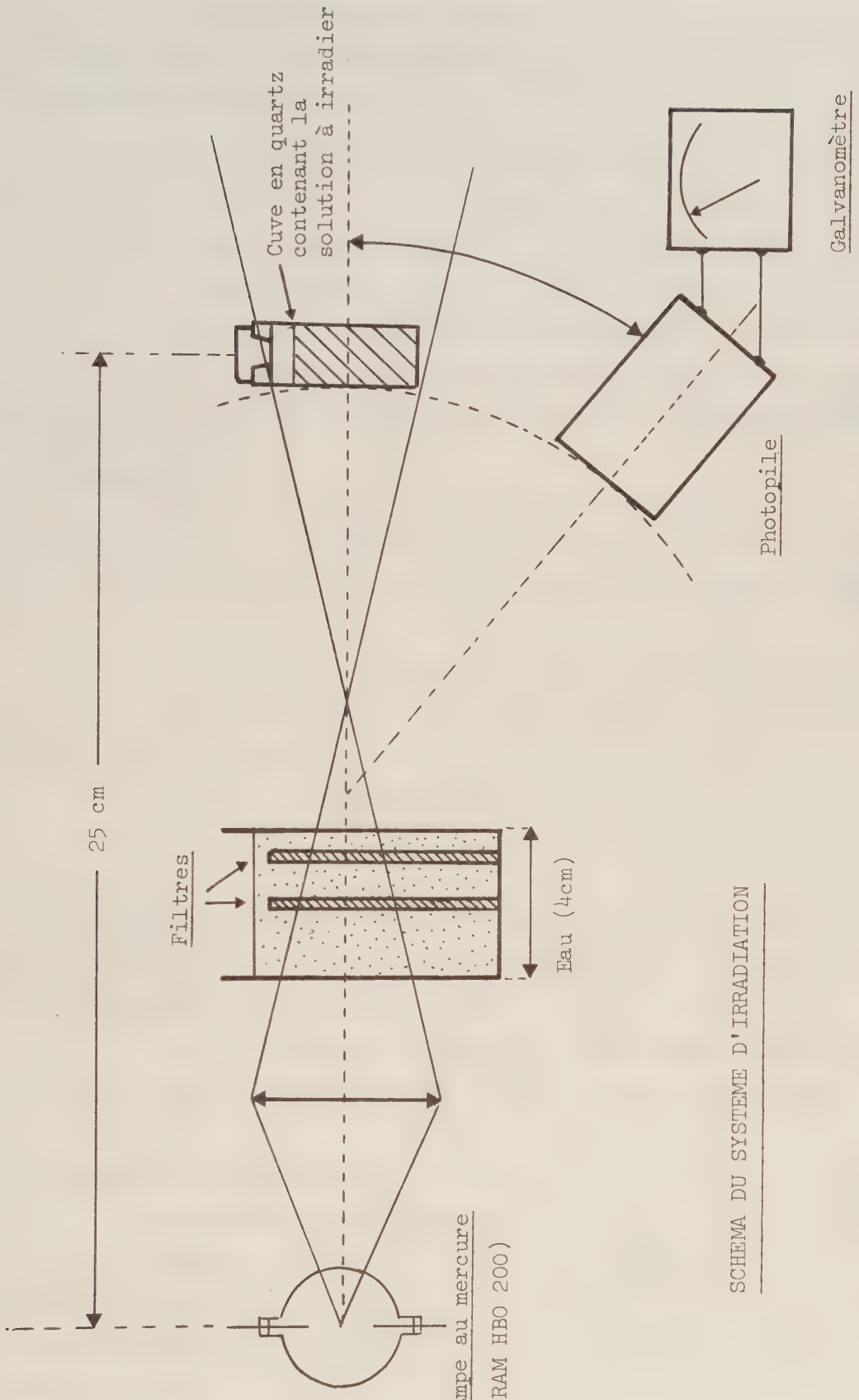
Les électrophorèses en présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS) ont été effectuées selon le procédé décrit par WEBER et OSBORN (1969).

Pour certaines expériences, l'utilisation d'un gel de concentration à 2,5 % en acrylamide et 0,5 % en agarose a été nécessaire.

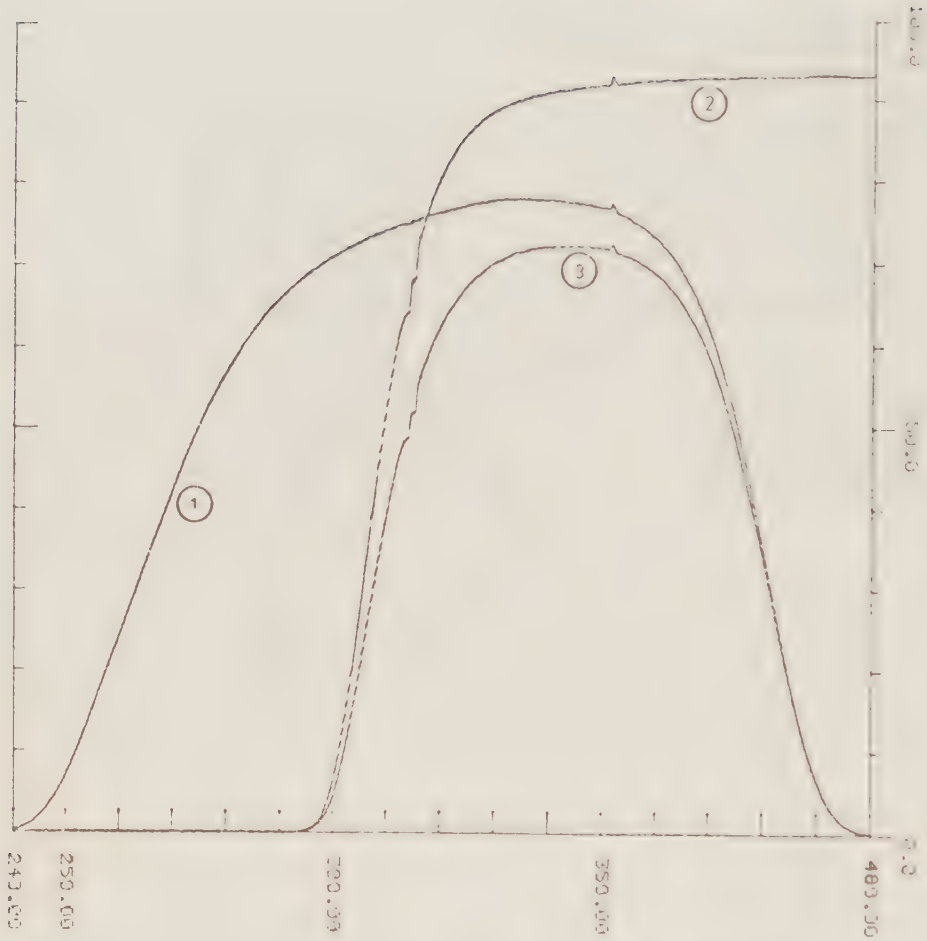
La dénaturation des protéines est effectuée en portant la solution à ébullition pendant 3 minutes, et la détection des bandes protéiques après électrophorèse a été faite par coloration au bleu de coomassie brillant R 250.

6) Ultracentrifugation

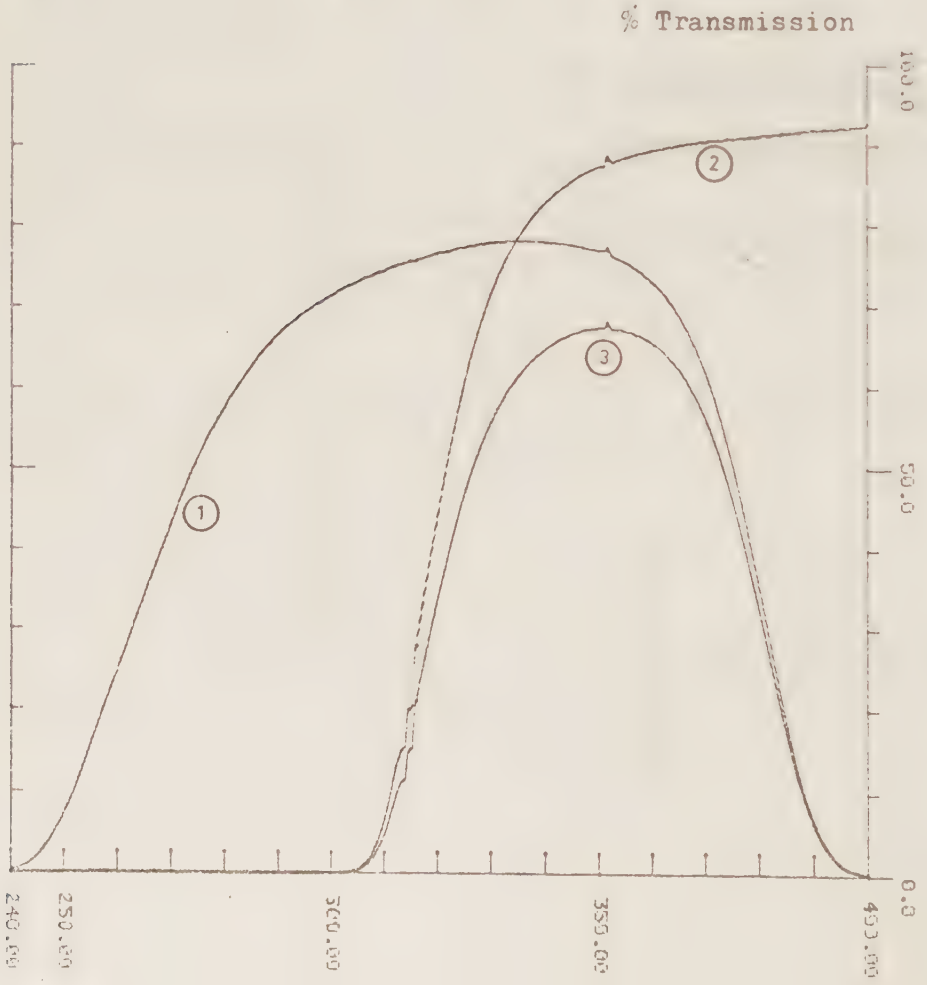
Cette technique a été utilisée pour calculer le pourcentage de substitution en brome de l'ADN BrU préparé.



SCHEMA DU SYSTEME D'IRRADIATION



I: Filtre MTO H 325a
2: Filtre MTO J 310a
3: Filtres MTO J 310a
et MTO H 325a



SPECTRES DE TRANSMISSION DES FILTRES UTILISES LORS DES EXPERIENCES D'IRRADIATION

I: Filtre MTO H 325a
2: Filtre MTO J 324a
3: Filtres MTO H 325a
et MTO J 324a

La centrifugation par gradient de densité à l'équilibre a été faite dans une solution de chlorure de césium (CsCl) avec une ultracentrifugeuse analytique Beckman E.

Les solutions analysées ont été préparées comme suit :

. 1,2 g CsCl
. 7 µg ADN d'E. coli
. 7 µg ADN BrU
. qsp 2,08 g tampon citrate de sodium 15 mM, NaCl 0,15 M

L'ADN d'E. coli, de densité connue (1,7100) est ici utilisé comme marqueur dans une solution dont la densité est mesurée précisément avant l'analyse.

C'est l'ADN d'E. coli ainsi que la densité de CsCl au point d'isoconcentration qui permettent, après 48 heures de centrifugation à 44 770 rpm, de calculer la densité de l'ADN BrU (SZYBALSKY et SZYBALSKY, 1971).

A partir de cette densité, il est aisé de calculer le pourcentage de substitution en brome de l'ADN BrU (HACKETT et HANAWALT, 1966; MANDEL et col., 1968).

$$\% \text{ BrU} = \frac{(d - d^\circ) \times 100}{d_1 - d^\circ}$$

d° = densité de l'ADN d'E. coli = 1,710 (0 % de substitution en brome)
d_1 = densité de l'ADN d'E. coli BrU = 1,802 (100 % de substitution en brome)
d = densité de l'ADN mesurée

Nous avons ainsi pu évaluer le pourcentage de substitution en brome de l'ADN BrU préparé : 65 à 70 % selon les préparations.

7) Hydrolyses enzymatiques

a) Enzymes protéolytiques

Pour les expériences nécessitant la présence de protéases sélectives nous avons utilisé de la trypsine TPCK et de la chymotrypsine TLCK respectivement dépourvues de toute activité chymotrypsique et trypsique.

Les hydrolyses trypsiques sont stoppées par l'addition d'inhibiteur trypsique de soja, tandis que le PMSF est utilisé pour l'inhibition de la chymotrypsine. Les protocoles d'hydrolyse, propres à chaque expérience seront décrits dans les différents chapitres exposant les résultats.

b) Désoxyribonucléase I (DNase I)

Les hydrolyses DNasiques ont été effectuées lors de la préparation du double complexe ADN-répresseur dans les conditions suivantes :

- Tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, DTE 10^{-4} M
- $MgCl_2$ 10 mM
- DNase I : 2,5 % (m/m)

Une première hydrolyse est effectuée pendant 24 heures à 34°C. 2,5 % d'enzymes sont ensuite rajoutés pour une deuxième hydrolyse de 24 heures à 25°C sous dialyse contre un grand excès du même tampon. Ce procédé permet une hydrolyse plus complète du complexe oligonucléotides-répresseur du fait de l'élimination progressive par dialyse des nucléotides et oligonucléotides provenant de l'hydrolyse DNasique.

8) Analyse d'acides aminés

La préparation des échantillons jusqu'à leur passage sur l'analyseur sera décrite dans le paragraphe VIII.

Toutes les analyses ont été réalisées sur un système de chromatographie Biotronik LC 6000 E en utilisant une résine DC 4 A (Durrum Dionex). Après fixation, les échantillons sont élués par l'utilisation successive des tampons suivants :

Tampon A : Na 0,18 M (citrate de sodium 0,06 M, HCl) pH 3,28 pendant 13 mn à 48°C.

Tampon B : Na 0,76 M (citrate de sodium 0,06 M, NaCl 0,58 M, HCl) pH 3,9 durant 10 mn à 48°C puis pendant 20 mn à 54°C.

Tampon C : Na 1,50 M (citrate de sodium 0,06 M, NaCl 1,32 M, HCl) pH 4,35 durant 15 mn à 54°C puis pendant 25 mn à 65°C.

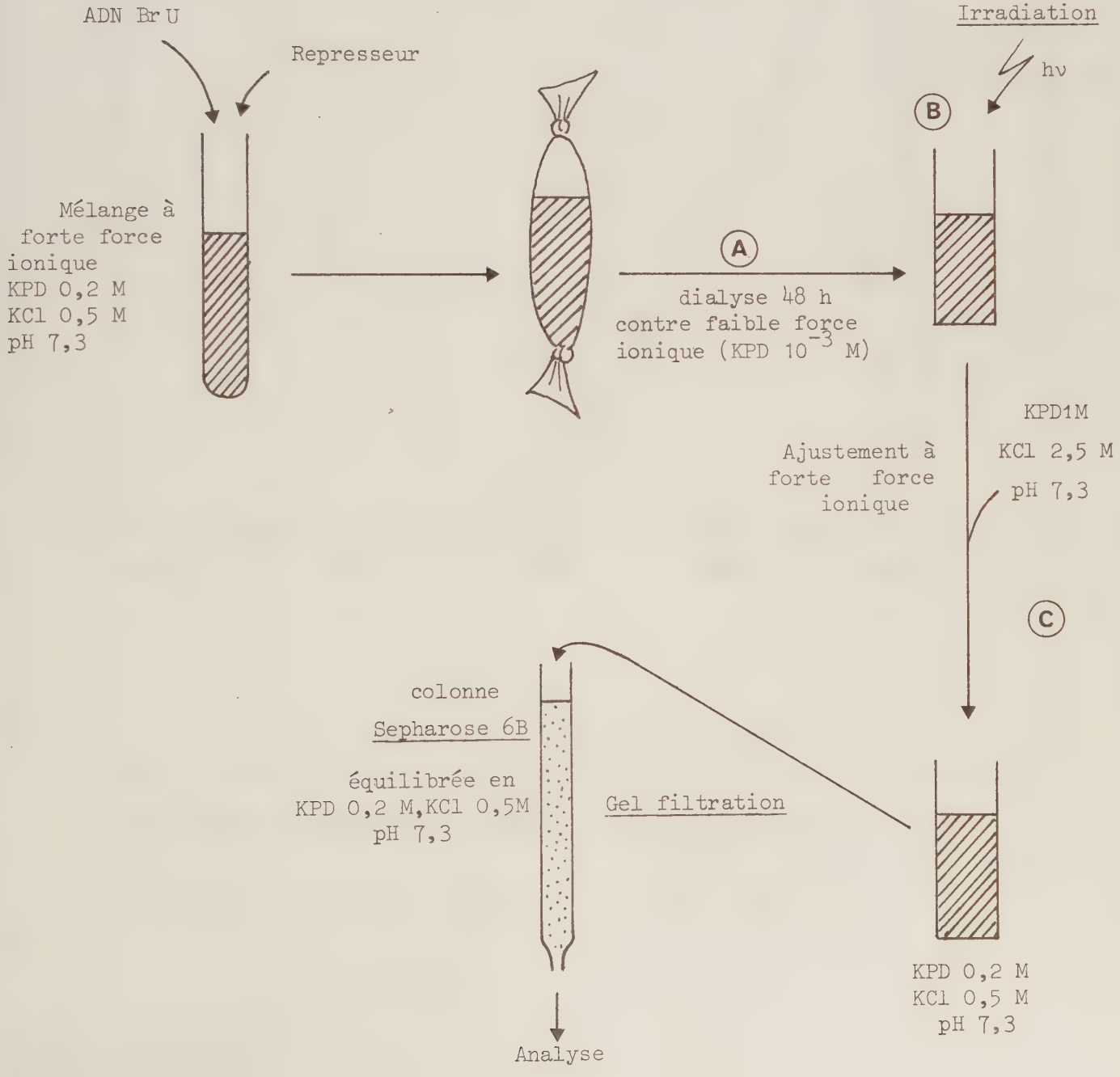
Pour ces analyses, nous avons utilisé une colonne de 6 mm de diamètre et de 17,5 cm de hauteur.

L'intégration des pics d'élution est effectuée d'une part à l'aide d'un intégrateur Spectra-physics SP 4100 et d'autre part manuellement à l'aide d'un planimètre.

III - ETUDE DU COMPLEXE PONTE ADN BrU-REPRESSEUR

A) PONTAGE PHOTOCHIMIQUE ADN BrU-REPRESSEUR

L'existence du complexe ADN-represseur à faible force ionique (KPD 10^{-3}M pH 7,3), a été contrôlée, avant irradiation, par dichroïsme circulaire (cf figure III_1). Les spectres sont corrigés en fonction de la contribution du represseur (cf figure III_2). Lors de l'expérience de pontage photochimique, nous avons adopté, pour montrer un éventuel pontage ADN BrU -represseur, le protocole expérimental suivant :



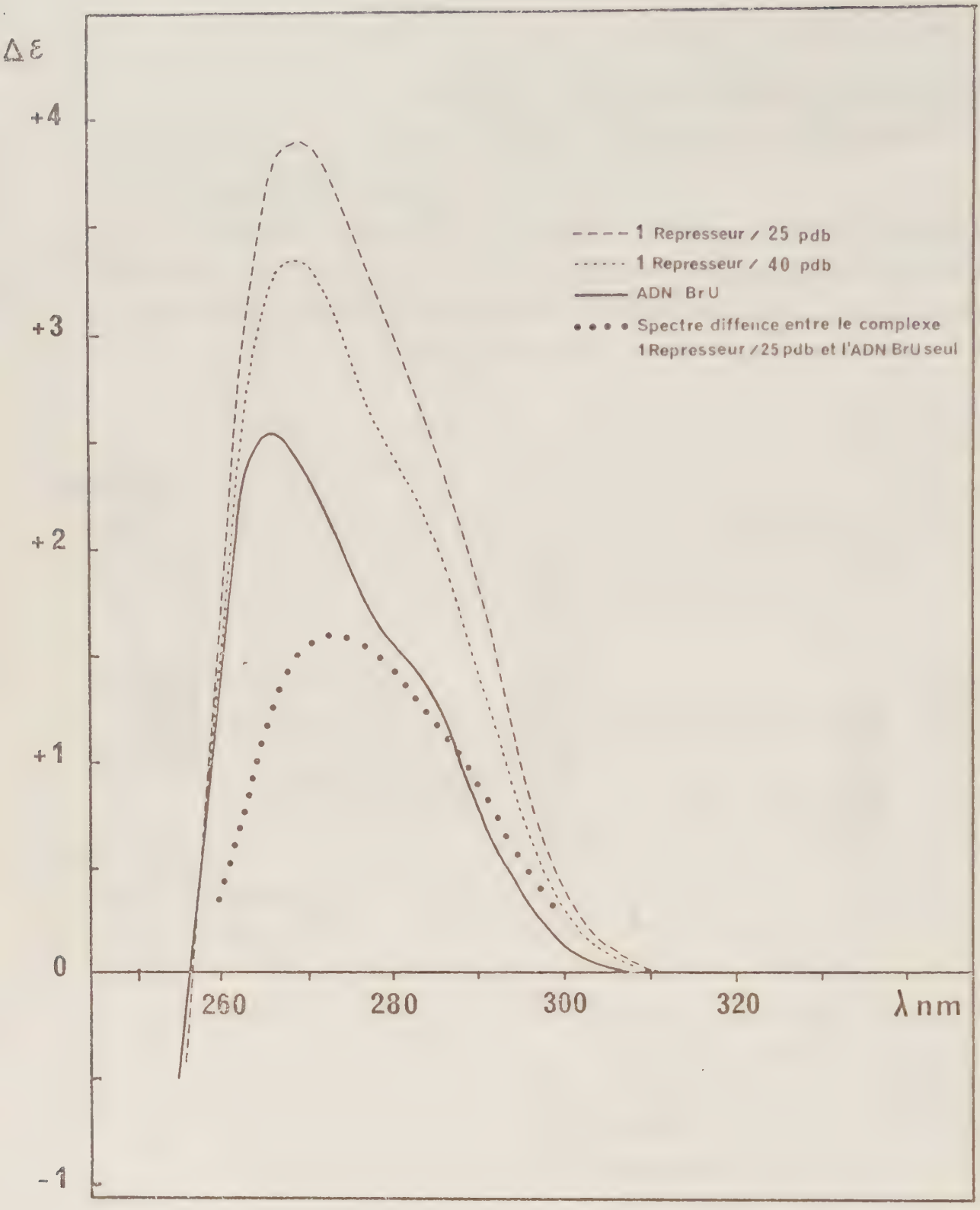


Figure III$_1$: Spectres de dichroïsme circulaire de l'ADN BrU et du complexe represseur-ADN BrU .

Les spectres sont corrigés en fonction de la contribution du represseur.

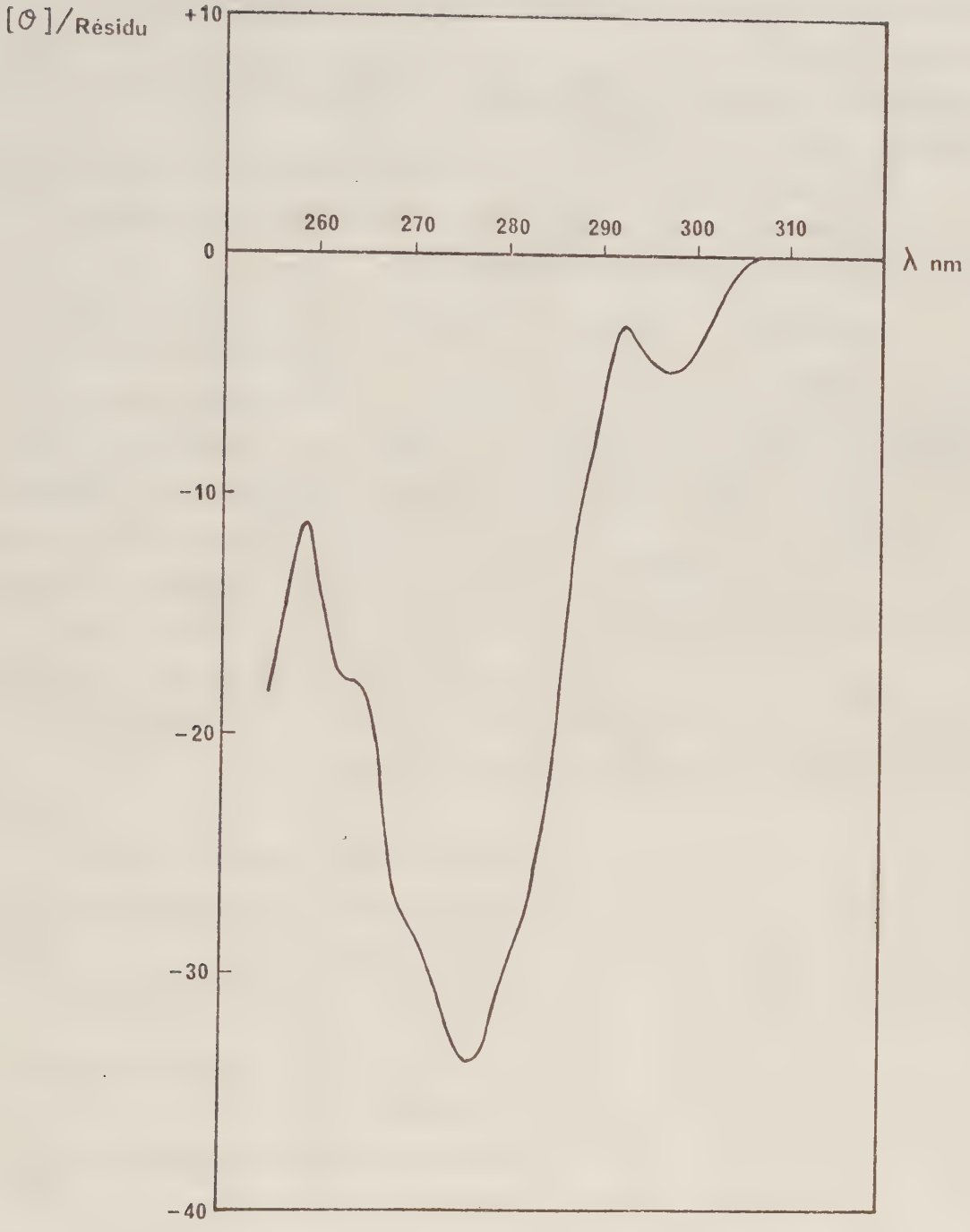


Figure III_2 : Spectre de dichroïsme circulaire du represseur.

(A) Formation du complexe à faible force ionique (KPD 10^{-3}M pH 7,3). Contrôle en dichroïsme circulaire avant irradiation.

(B) Pour le témoin, nous avons choisi d'ajuster la force ionique (→ KPD 0,2 M KCl 0,5 M pH 7,3) avant l'irradiation. Celle-ci est donc effectuée sur du complexe dissocié.

(C) L'ajustement à forte force ionique après irradiation provoque la dissociation des complexes non pontés.

Les résultats sont ensuites contrôlés par tamisage moléculaire sur colonne de sépharose 6B, le principe de la séparation des différents produits est détaillé dans le paragraphe II D.

Les profils d'élution sont obtenus par spectroscopie d'absorption ou de fluorescence (cf figure III_3 et $_{3'}$). En spectroscopie d'absorption,la lecture des différentes fractions, effectuée à 280, 260 et 230 nm nous a permis d'évaluer précisément les concentrations en acides nucléiques. Pour la détermination des concentrations en represseur, les mesures ont été faites par fluorescence à 340 nm (λ_{Exc} = 280 nm). Le spectre d'émission de fluorescence du répresseur présente un pic unique caractéristique de l'émission du tryptophane avec un maximum à 338 nm (LAIKEN et col. , 1972) (cf figure III_4).

Outre ces mesures, des évaluations des concentrations en represseur et en ADN sont faites après collection des pics par décomposition des spectres d'absorption à différentes longueurs d'ondes :

$$X = \varepsilon_A C_A + \varepsilon_R C_R$$

$$\Rightarrow \boxed{\frac{X}{\varepsilon_A} = C_A + C_R \cdot \frac{\varepsilon_R}{\varepsilon_A}}$$

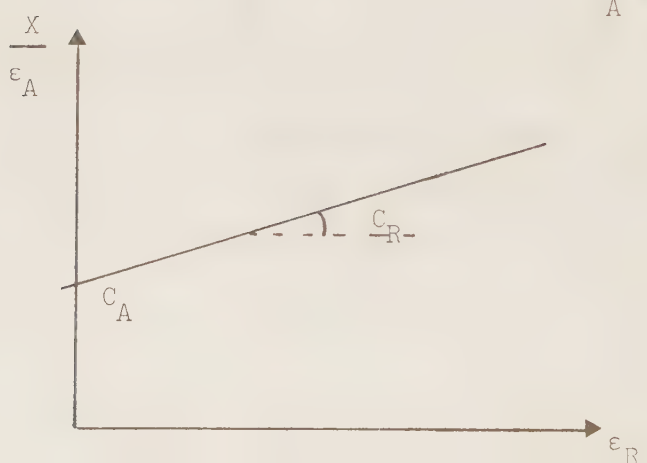
X = absorption du complexe à $\lambda = x$

ε_R = coefficient d'absorption molaire du represseur à $\lambda = x$

ε_A = coefficient d'absorption molaire de l'ADN à $\lambda = x$

C_R = concentration du represseur dans le complexe

C_A = concentration de l'ADN dans le complexe.



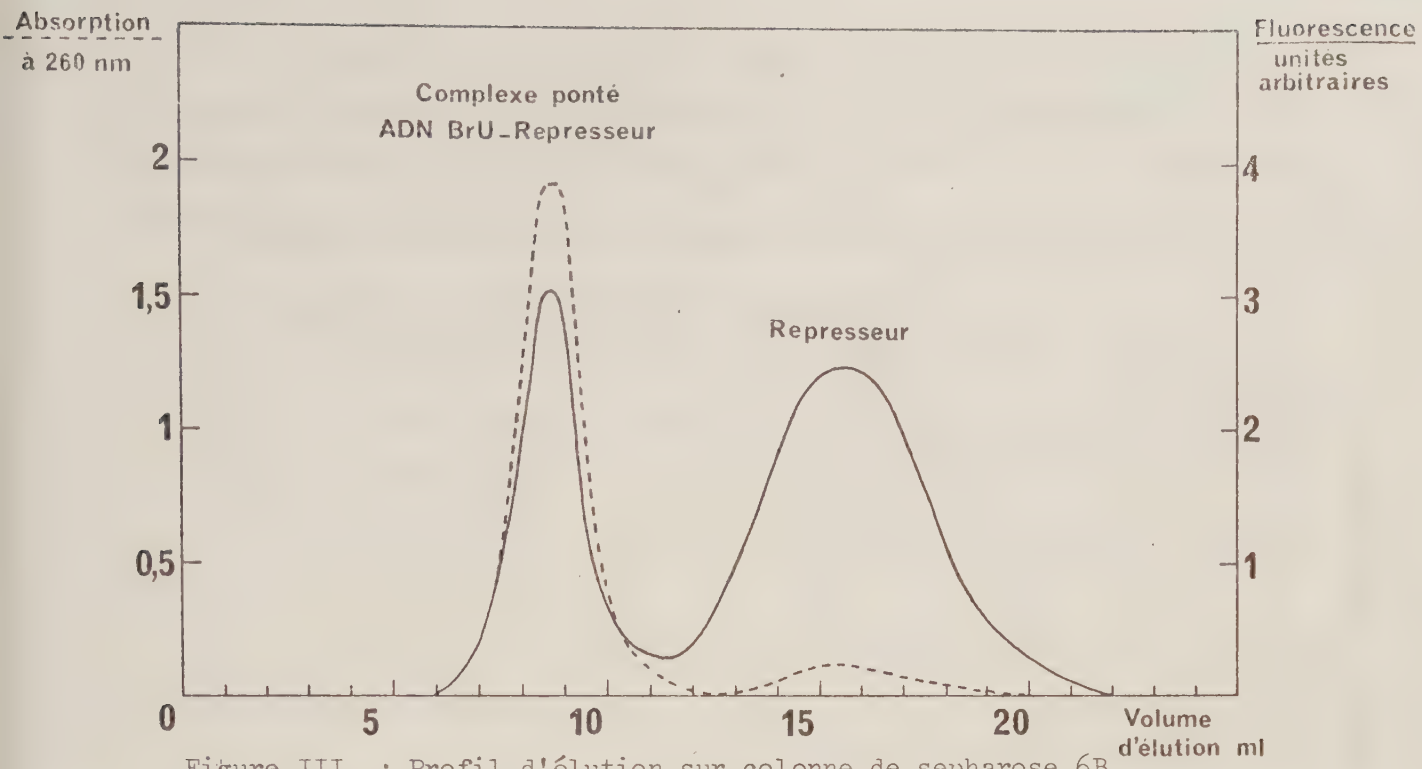


Figure III_3 : Profil d'élution sur colonne de sepharose 6B du complexe represseur-ADN BrU irradié à faible force ionique (KPD 10^{-3}M) et élué à forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M).

--- : Absorption —— : Fluorescence

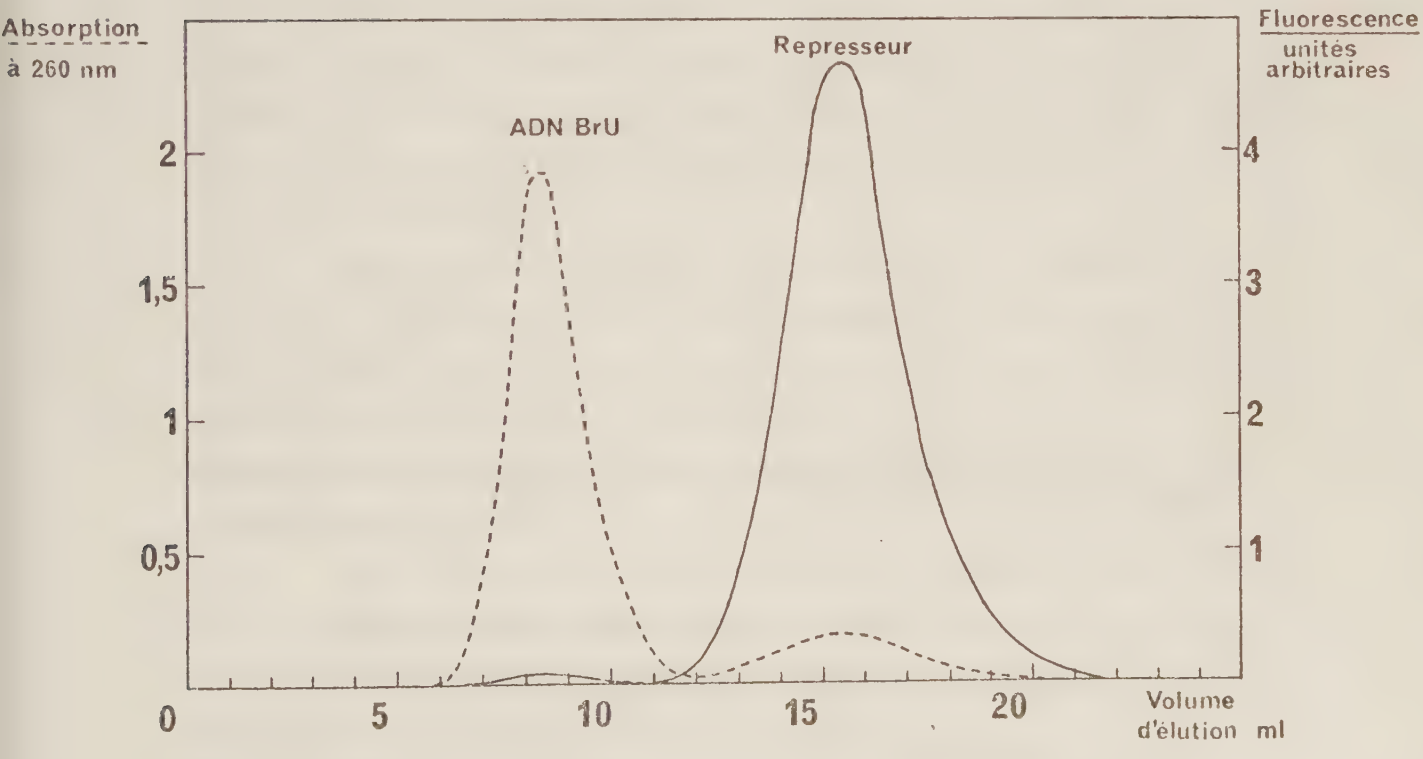


Figure $III_{3'}$: Profil d'élution sur colonne de sepharose 6B du complexe represseur-ADN BrU irradié et élué forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M).

---- : Absorption —— : Fluorescence.

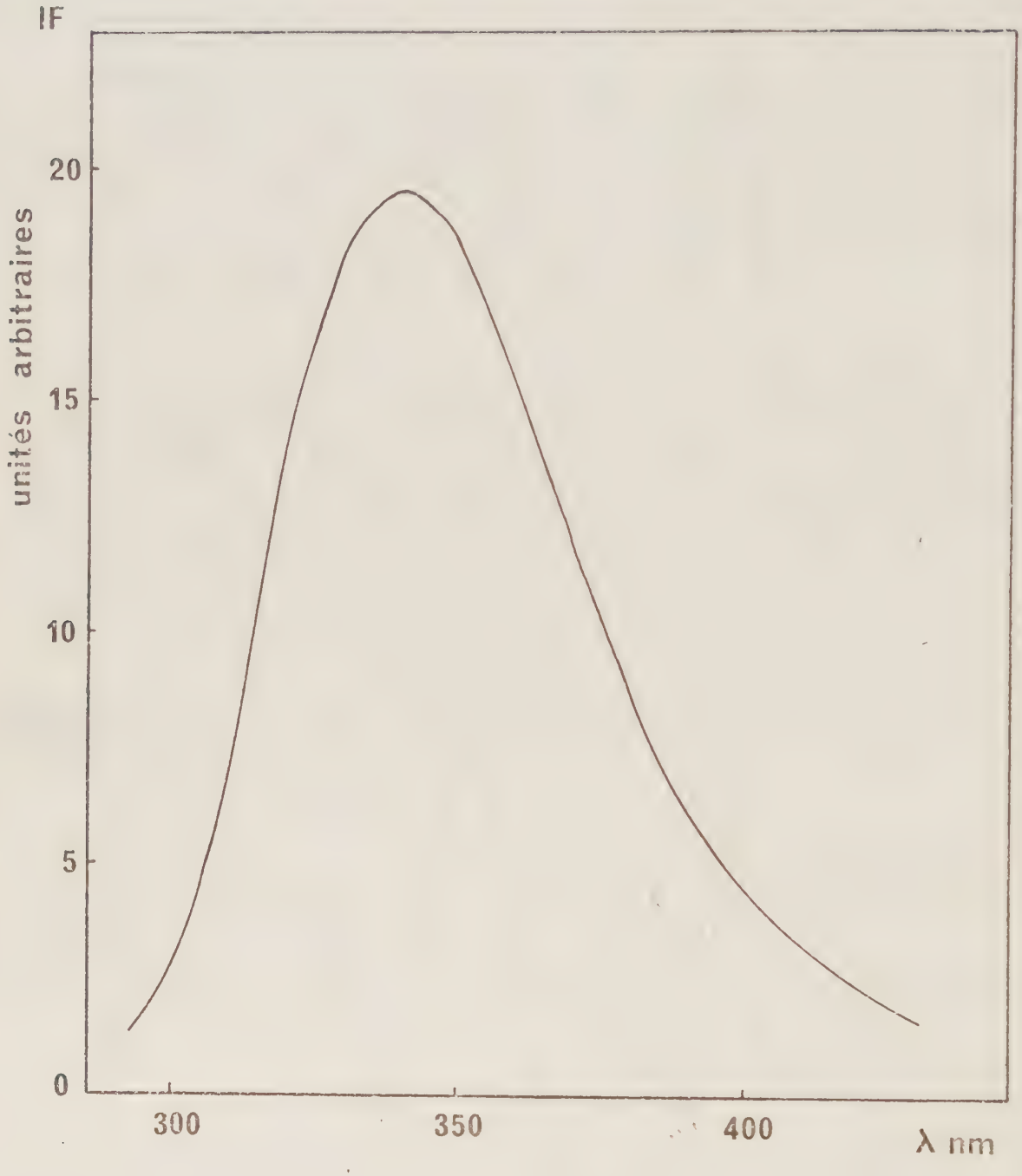


Figure III_4 : Spectre d'émission de fluorescence du represseur (10^{-6} M en tétramères, cuve 5 mm) à 25°C.
$\lambda_{Excitation}$ = 280 nm,

Dans le but d'étudier ce complexe, nous avons fait varier les paramètres expérimentaux pour trouver les conditions permettant d'obtenir le meilleur pourcentage de pontages photochimiques et la plus faible dégradation du répresseur.

B) INFLUENCE DES LONGUEURS D'ONDES D'IRRADIATION

Deux systèmes de filtres ont été utilisés :

1	. MTO H 325a	400 nm > λ > 240 nm	400 nm > λ > 295 nm
	. MTO J 310a	λ > 295 nm	
2	. MTO H 325a	400 nm > λ > 240 nm	400 nm > λ > 300 nm
	. MTO J 324a	λ > 300 nm	

Les concentrations en ADN et en répresseur utilisées pour ces tests sont les suivantes :

1 répresseur / 100 p.d.b. { ADN : 10^{-4} M en p.d.b. ; Rep : 10^{-6} M en tétramères

L'irradiation des complexes a été effectuée à faible force ionique dans du tampon KPD 10^{-3} M, pH 7,3 et les irradiations témoins ont été faites dans du tampon KPD 0,2 M, KCl 0,5 M, pH 7,3 sur des complexes dissociés. Toutes les mesures regroupées sur les différentes figures ont été faites par spectrophotométrie d'absorption ou par fluorescence à l'issue de la séparation par tamisage moléculaire des répresseurs libres et pontés.

En observant la figure III_5 qui exprime la fluorescence totale du répresseur mesurée à chaque temps d'irradiation pour chaque système de filtres, nous constatons que la dégradation photochimique du répresseur est comme attendu plus faible pour le deuxième système de filtres. Par ailleurs, nous avons pu observer que cette dégradation demeurait équivalente à faible et forte force ionique pour un même système de filtres.

Ces expériences nous ont également permis de mettre en évidence une forte dégradation de l'ADN (cf figure $III_{5'}$). En effet, outre la formation du photoproduit de couplage, l'irradiation provoque des ruptures simple-brin au niveau de l'ADN (LION, 1968; HUTCHINSON et HALES, 1970; HEWITT et col., 1969), l'importance de ces ruptures simple-brin étant environ trois fois plus grande que pour un ADN normal (LION, 1970; STEPHAN et col., 1970; HUTCHINSON et HALES, 1970). Ces ruptures ont entraîné pour

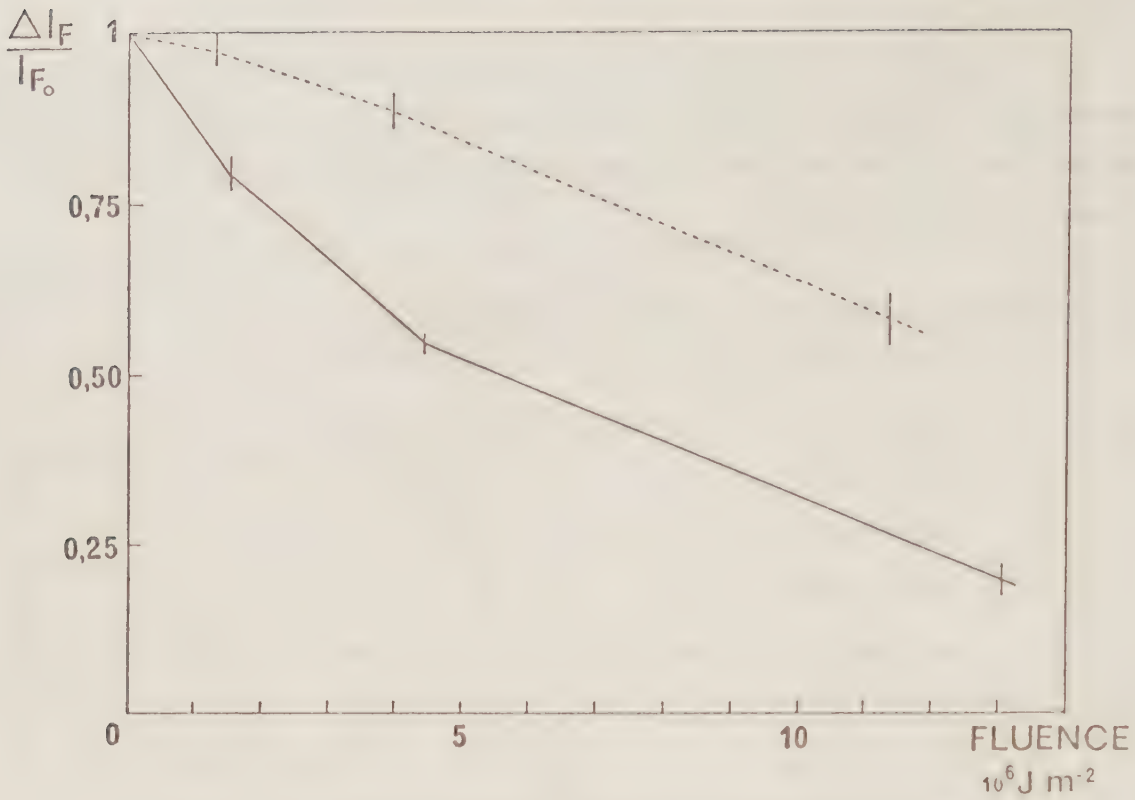


Figure III_5 : Détermination par fluorescence de la dégradation photochimique du represseur en fonction de la fluence et des longueurs d'onde d'irradiation. (- - - - - : 400 nm > λ > 300 nm; ——— : 400 nm > λ > 295 nm).
Fluorescence : λ_{Exc} = 280 nm, λ_{Em} = 340 nm.

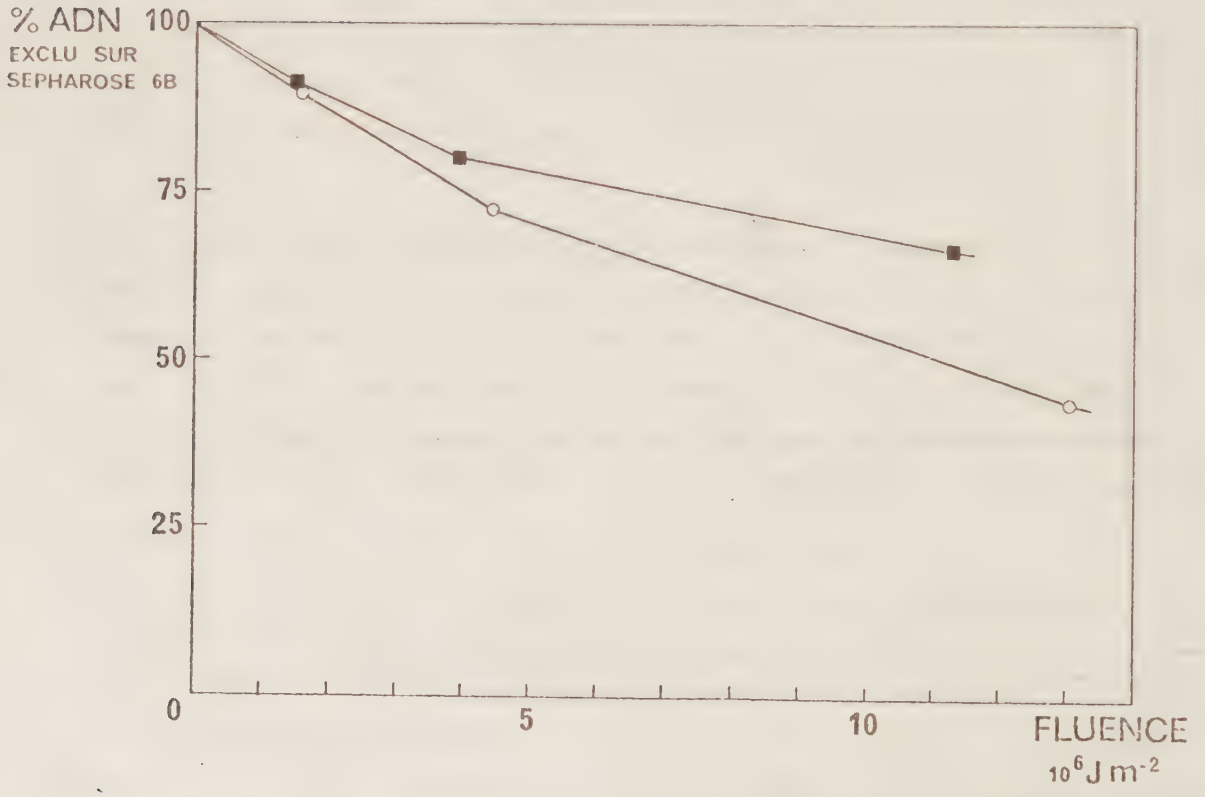


Figure $III_{5'}$: Polydispersité de l'ADN BrU sur sepharose 6B en fonction de la fluence et des longueurs d'onde d'irradiation.
(■—■—■ : 400 nm > λ > 300 nm, ○—○—○: 400 nm > λ > 295 nm).

ces expériences une augmentation de la polydispersité de l'ADN et en conséquence une mauvaise séparation en tamisage moléculaire.

A cause de cette polydispersité, il est difficile d'évaluer le pourcentage de répresseur ponté à l'ADN BrU pour des fluences supérieures à 4×10^6 J/m^2. Nous avons donc procédé par extrapolation. Pour tenir compte de l'augmentation de l'absorption de l'ADN BrU provoquée par les ruptures simple-brin au moment de l'irradiation, nous avons tout d'abord mesuré l'aborption totale de l'ADN à chaque temps d'irradiation avant la séparation par tamisage moléculaire. A partir de ces valeurs, nous avons pu déterminer pour chaque expérience la proportion d'ADN exclu sur Sepharose 6B (cf figure III_5,). En considérant que la proportion de répresseur ponté est la même sur la totalité de l'ADN, nous pu déterminer en tenant compte de la dégradation photochimique du répresseur (cf figure III_5) et de l'effet d'écran dû à l'ADN la proportion de répresseur ponté à chaque temps d'irradiation pour chaque système de filtres. Nous sommes ainsi parvenu à induire un maximum de 55 % de pontages photochimiques avec le système de filtres n°1 et environ 25 % avec le deuxième système de filtres.

Nous observons également que pour des fluences supérieures ou égales à 4×10^6 J/m^2, le taux de dégradation photochimique du répresseur est plus rapide que son taux de pontage.

Pour toutes les autres expériences, nous irradirons donc aux longueurs d'ondes suivantes : 400 nm > λ > 295 nm (système de filtres n°1) et les fluences que nous utiliserons seront inférieures à 4×10^6 J/m^2.

C) CINETIQUE DE PONTAGE EN FONCTION DE LA FLUENCE

Pour cette étude, nous utiliserons le système de filtres MTO H 325a et J 310a. Les concentrations en ADN et en répresseur sont les suivantes :

1 répresseur / 40 p.d.b. { ADN : 10^{-4} M en p.d.b. ; Rep : $2,5 \times 10^{-6}$ M en tétramères

Toutes les mesures ont été effectuées après séparation des répresseurs libres et pontés par tamisage moléculaire. Les résultats ont été corrigés en tenant compte de l'effet d'écran et les calculs ont été faits en considérant que la diminution de fluorescence est la même pour les répresseurs libres et pontés.

Nous savons que la sensibilité de l'ADN BrU aux U.V. est proportionnelle à la concentration de Thd substituée par la 5-BrdUrd (GREER, 1960). Le pontage photochimique ADN-répresseur ne dépend donc pendant l'irradiation que de la quantité de 5-BrdUrd non modifiée photochimiquement. Cette réaction peut être assimilée à une cinétique d'ordre 1 où la vitesse de pontage, pour un pourcentage de substitution donné, dépend de la proximité des groupements pouvant réagir entre eux. L'évaluation à chaque temps d'irradiation de la proportion de répresseur ponté à l'ADN BrU lors des irradiations à faible force ionique (KPD 10^{-3} M, pH 7,3), nous permet effectivement de mettre en évidence une telle cinétique de couplage (cf figure III_6). Lorsque l'irradiation est effectuée à forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M, pH 7,3), aucun pontage du répresseur n'est observé.

Quand nous observons la diminution de fluorescence du répresseur en fonction de l'énergie lumineuse reçue, nous constatons que la dégradation photochimique de la protéine est indépendante de la cinétique de couplage. Cependant, nous observons que la dégradation du tryptophane dans le répresseur irradié seul à forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M, pH 7,3) et aux mêmes concentrations, est plus importante que lorsque le répresseur est irradié en présence d'ADN (cf figure III_7). Or, aux longueurs d'ondes d'irradiation utilisées, le nombre de photons absorbés par l'ADN peut être considéré comme négligeable, et un effet d'écran dû à l'ADN est à exclure. Une explication à ce phénomène consisterait à admettre un transfert d'énergie des tryptophanes vers l'ADN substitué à la 5-BrdUrd, dont l'énergie du premier état singulet est inférieure à celle des bases normales. Dans ce cas, la durée de vie de l'état excité des tryptophanes serait trop courte pour permettre leur photolyse.

L'émission de fluorescence légèrement plus importante du répresseur après l'irradiation du complexe à faible force ionique pourrait quant à elle s'expliquer par des modifications locales de conformation du répresseur qui pourraient diminuer l'accessibilité du tryptophane à l'oxygène et limiter ainsi sa photodégradation.

Enfin, une polydispersité légèrement plus importante de l'ADN est observée à forte force ionique. En effet, dans ces conditions, l'irradiation ne provoque, outre les modifications photochimiques des bases, que des coupures simple-brin sur l'ADN.

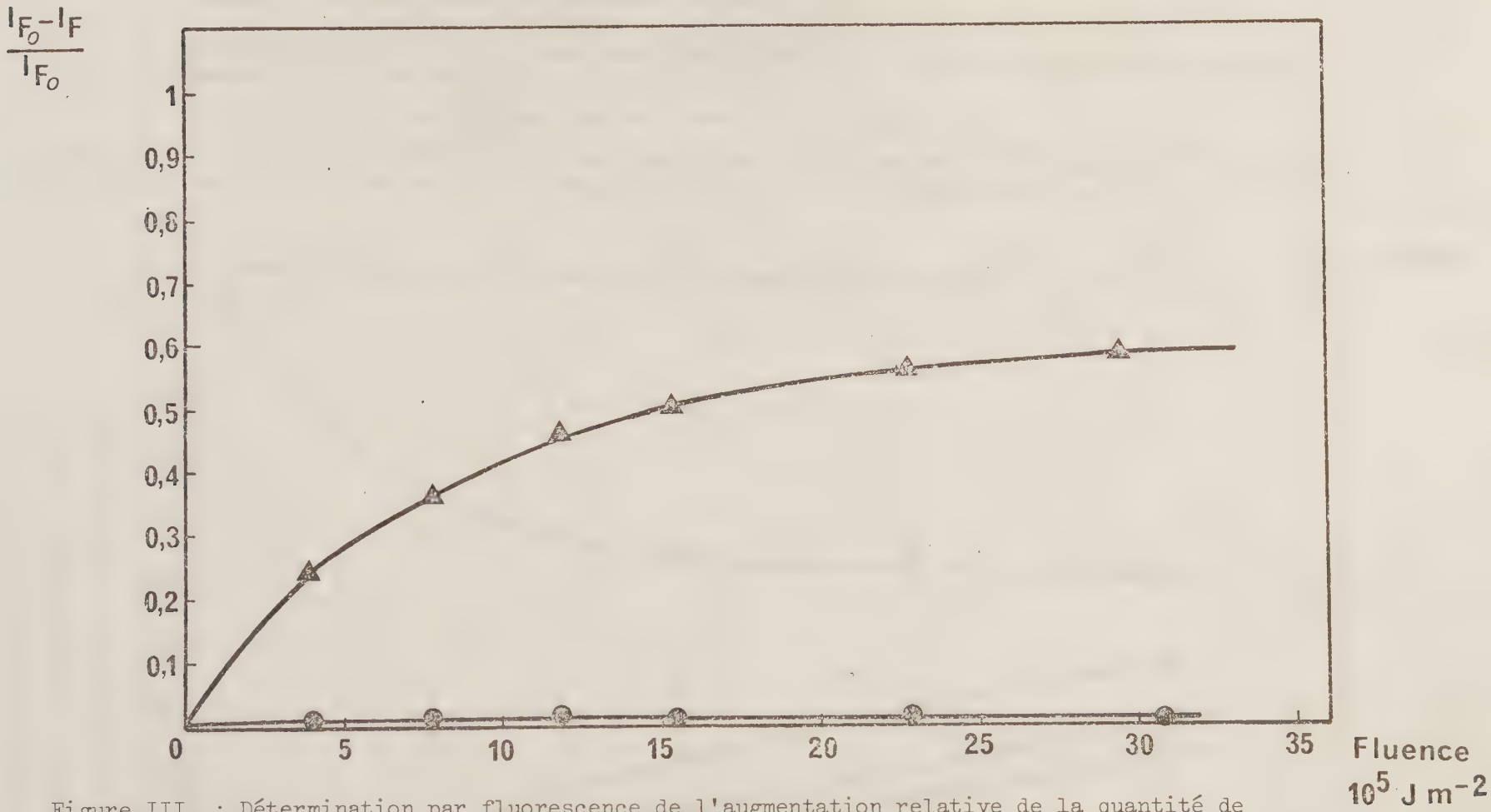


Figure III$_6$: Détermination par fluorescence de l'augmentation relative de la quantité de répresseur ponté à l'ADN BrU en fonction de l'énergie lumineuse incidente.
λ_{Exc} = 280 nm et λ_{Em} = 340 nm

IF = Fluorescence du répresseur ponté
IF_o = Somme de la fluorescence des répresseurs libres et pontés à chaque temps d'irradiation

▲—▲ = Irradiations à faible force ionique (KPD 10^{-3} M)
●—● = Irradiations à forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M)

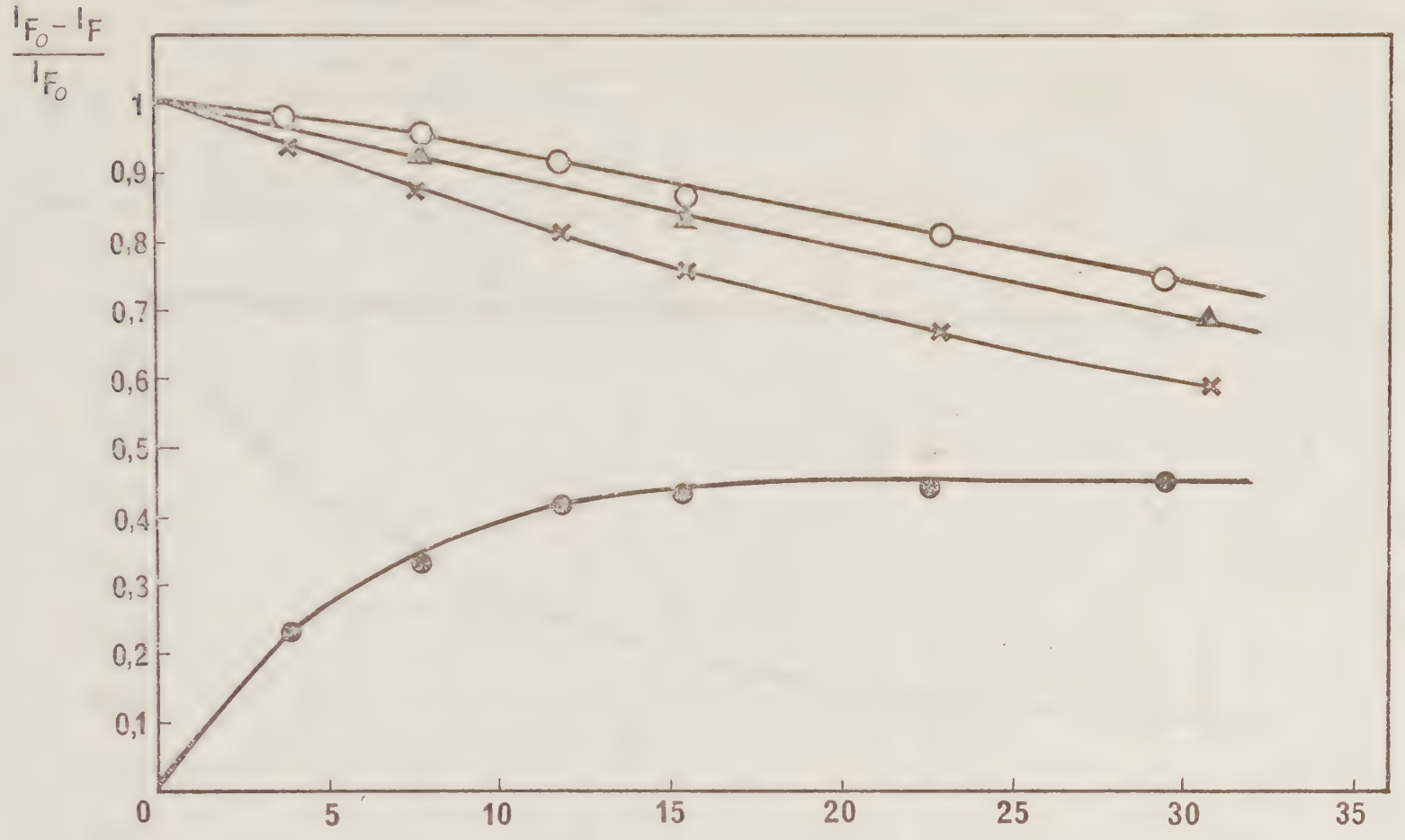


Figure III$_7$: Variation relative de l'intensité de fluorescence du répresseur en fonction de l'énergie lumineuse reçue et selon les conditions d'irradiation (λ_{Exc} = 280 nm, λ_{Em} = 340 nm)

IF_o = Fluorescence du répresseur au temps d'irradiation t = 0

●-●-● IF = Fluorescence du répresseur ponté

▲-▲-▲ IF = Somme de la fluorescence des répresseurs libres et ponté après irradiation à faible force ionique (KPD 10^{-3} M)

×-×-× IF = Fluorescence du répresseur irradié seul

○-○-○ IF = Somme de la fluorescence des répresseurs libres et pontés après irradiation à forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M)

Pour augmenter le rendement de pontage entre le répresseur et l'ADN, il faudrait modifier la nature des intéractions ADN-répresseur en changeant l'acide nucléique (opérateur substitué au 5-BrdUrd, poly d(A-BrU)) ou en augmentant le pourcentage de substitution en BrdUrd. Une autre possibilité serait d'accroître la probabilité pour que les groupements réactionnels puissent réagir entre eux. Pour cela, il serait par exemple possible de diminuer le temps de vie du complexe en augmentant la force ionique, et provoquer ainsi des phénomènes de relargages-réassociation durant la durée de l'irradiation. Dans les conditions d'irradiation utilisées (KPD 10^{-3} M), le temps de vie du complexe répresseur-ADN non substitué mesuré par diffusion des neutrons (CHARLIER, communication personnelle) est de 40 heures. La constante d'association mesurée pour des acides nucléiques substitués à la 5-BrdUrd étant plus importante que pour des ADN non substitués (LIN et RIGGS, 1972a), ce temps de vie ne peut être que plus important et la durée de l'irradiation (1 heure maximum) est négligeable par rapport au temps de vie du complexe. Les irradiations se font donc sur des systèmes apparemment figés, et les répresseurs complexés sur des sites où aucun pontage n'est possible ne seront pas liés.

Cette expérience nous aura permis de démontrer qu'il est possible de ponter dans les conditions que nous venons de définir 60 % du répresseur complexé à l'ADN BrU (cf figure III_6). Le meilleur rendement est obtenu pour 45 à 50 % de répresseur ponté pour une dégradation photochimique n'excédant pas 10 %. Pour la suite des expériences, les irradiations se feront en utilisant une fluence comprise entre 1 et 1,5 x 10^6 J/m^2 ce qui correspond approximativement à une durée d'irradiation comprise entre 20 et 25 minutes.

IV - ETUDE DU NOMBRE DE SITES DE FIXATION LORS DES INTERACTIONS NON SPECIFIQUES

A) PRINCIPE DE L'EXPERIENCE

Récemment, O'GORMAN et col. (1980) et CULARD et MAURIZOT (1981) ont montré la présence de 2 sites pour l'opérateur sur un répresseur tétramérique, ces observations étant en accord avec les modèles de DUNAWAY et col. (1980), CHARLIER et col. (1981) et Mc. KAY et col. (1982).

Dans le cas des interactions avec des ADN non-opérateur, la présence de deux sites de fixation sur le represseur, bien que probable, n'a jamais pu être démontrée. En effet, dans un tel système deux facteurs interviennent :

- l'encombrement stérique dû aux deux ADN non-opérateur
- un phénomène de répulsion entre les deux acides nucléiques dû aux charges électrostatiques des groupements phosphates.

Pour mettre en évidence la présence de deux sites non-opérateur sur le represseur de l'opéron lactose, nous avons choisi de procéder en trois étapes :

. fixation et pontage photochimique d'un ADN non opérateur sur le represseur

. hydrolyse de cet ADN par des nucléases

. fixation et pontage photochimique d'un autre ADN non-opérateur sur le même represseur.

B) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les concentrations suivantes ont été utilisées :

1 represseur/40 paires de bases { ADN $2,5 \times 10^{-4}$ M en p.d.b. ; Rep. $6,25 \times 10^{-6}$ M en tétramère

Après irradiation, le complexe ponté (complexe I) a été isolé selon le protocole décrit au paragraphe III A 1.

Dans la recherche des conditions d'hydrolyse, nous nous sommes heurtés à plusieurs types de difficultés.

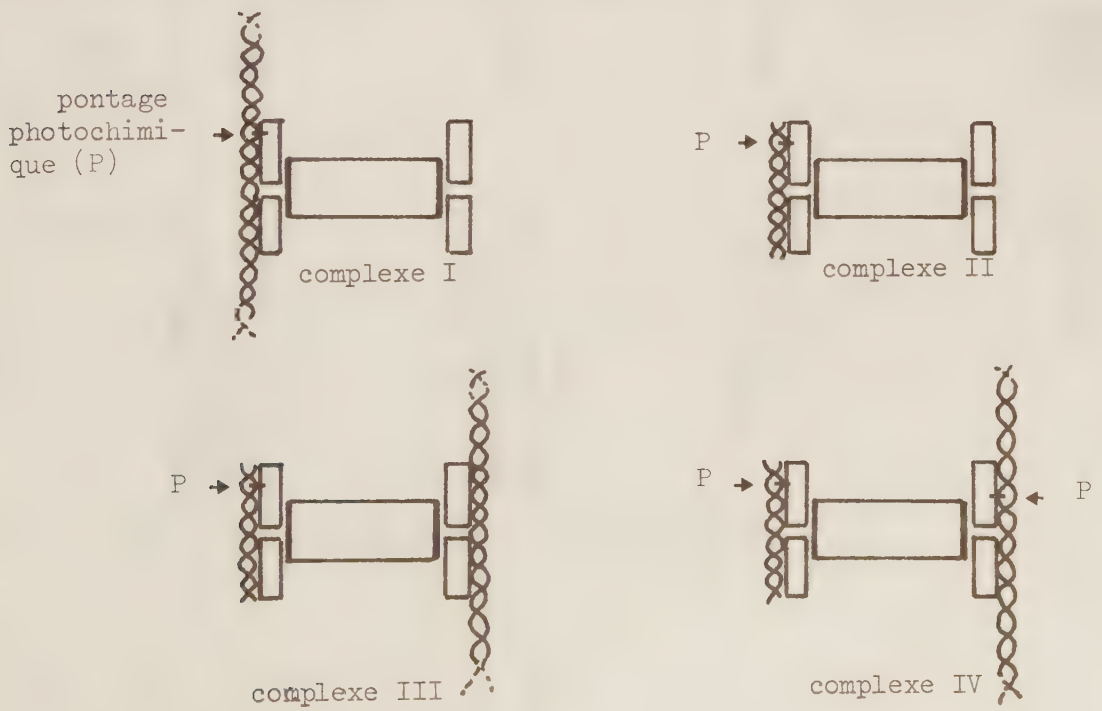
En effet, les différents types de nucleases utilisées (Nuclease micrococcale et DNase I) ne sont actives qu'à faible force ionique. A l'inverse du complexe I, le complexe ADN-represseur après hydrolyse DNasique

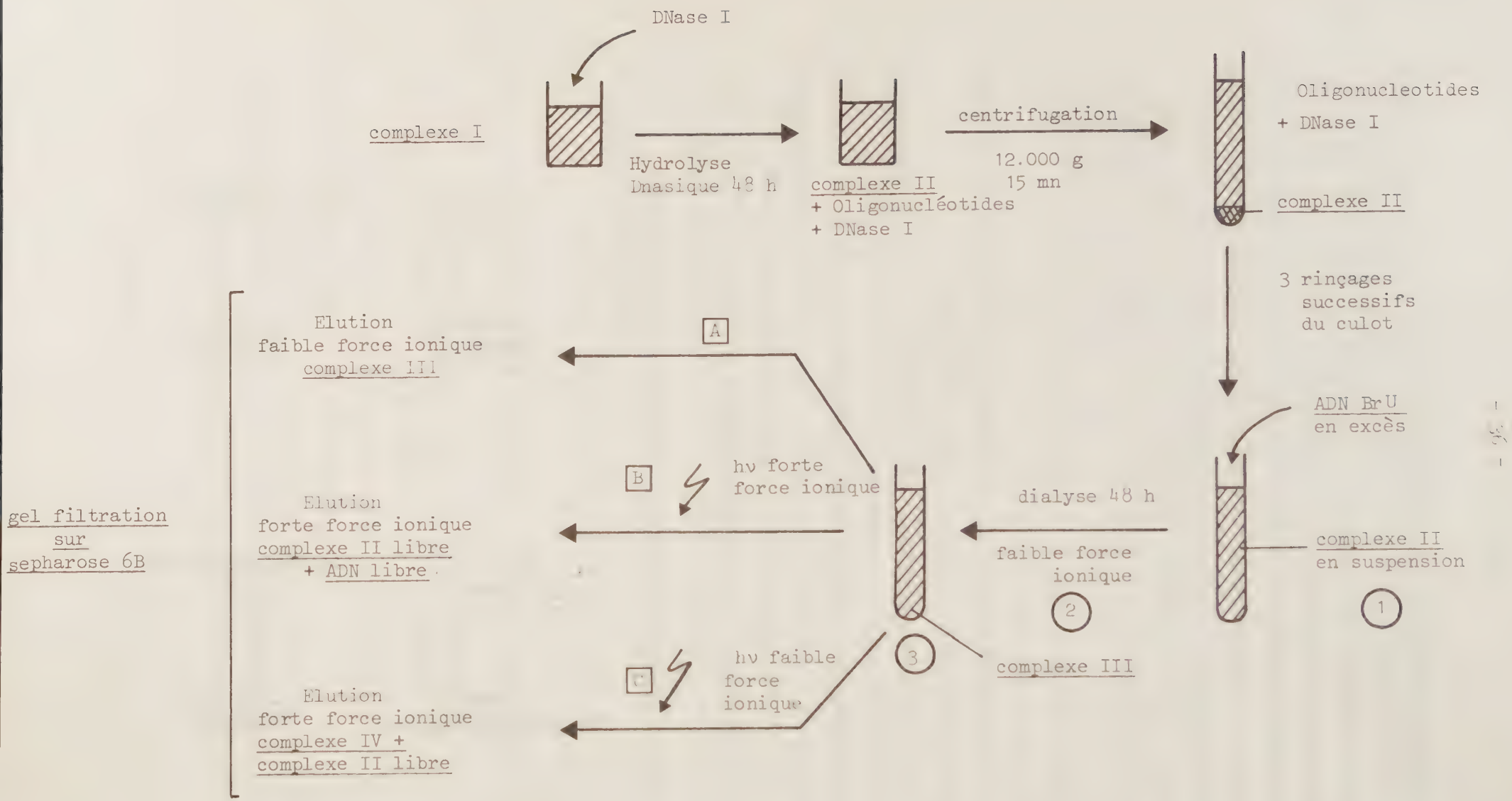
poussée (complexe II) précipite à faible force ionique, la quantité d'ADN restant fixée au répresseur n'étant probablement plus suffisante pour le maintenir en solution. Les augmentations de force ionique n'ont pas permis la remise en solution du précipité. Pour remédier à cette difficulté, nous avons effectué les hydrolyses à des forces ioniques croissantes jusqu'à des concentrations en sels permettant de maintenir le complexe répresseur-oligonucléotides en solution (0,01 M → 0,2 M tampon Tris-Hcl pH 8). Lors de ces expériences, outre de constants problèmes de précipitation, nous avons été contraints d'utiliser des quantités croissantes d'enzymes pour obtenir des coupures efficaces. L'élimination totale de l'activité nucléasique devient alors impossible, ce qui écarte toute possibilité de formation du double complexe.

Nous avons alors tenté d'utiliser la précipitation du répresseur à faible force ionique pour réaliser cette expérience.

En dehors des techniques de dénaturation, il nous a semblé que le moyen de ressolubiliser le répresseur précipité pouvait être de le refixer sur un autre ADN. On peut en effet observer que lors de la formation du complexe entre l'ADN et le répresseur, ce dernier passe transitoirement par un état insoluble avant sa fixation sur les acides nucleiques. Nous avons alors mis au point le protocole suivant, l'hydrolyse DNasique étant effectuée dans les conditions décrites au paragraphe II E 7 b (page 20).

. Les différents complexes porteront les appellations suivantes:




DNase I
complexe I
Hydrolyse
Dnasique 48 h
complexe II
+ Oligonucléotides
+ DNase I
centrifugation
12.000 g
15 mn
Oligonucleotides
+ DNase I
complexe II
3 rinçages
successifs
du culot
ADN BrU
en excès
complexe II
en suspension
1
dialyse 48 h
faible force
ionique
2
3
complexe III
A
B
hν forte
force ionique
C
hν faible
force
ionique
Elution
faible force ionique
complexe III
Elution
forte force ionique
complexe II libre
+ ADN libre
Elution
forte force ionique
complexe IV +
complexe II libre
gel filtration
sur
sepharose 6B

(1.) Après chaque centrifugation, le complexe est remis en suspension dans du tampon KPD 10^{-3} M pH 7,5, EDTA 5 x 10^{-4} M, ces centrifugations ont pour but d'éliminer la DNase en solution, et l'EDTA d'inhiber l'activité DNasique.

(2.) Dialyse dans KPD 10^{-3} M, EDTA 5 x 10^{-4} M, pH 7,5 dans le but d'éliminer le double complexe.

(3.) Lors de la fabrication du complexe III, la solution dialysée est centrifugée pour éliminer le complexe II qui ne s'est pas remis en solution.

C) RESULTATS

Les résultats de l'expérience sont regroupés dans le tableau suivant :

Procédé	Tampon irradiation	Tampon élution	% represseur complexé	% represseur libre	conclusions
A		f	100	-	double fixation
B	F	F	< 10	> 90	pas de fixation
C	f	F	45-50	50-55	double pontage

Tableau : Mise en évidence de deux sites de fixation non spécifiques sur le répresseur , analyse des résultats par fluorescence après tamisage moléculaire. (λ_{Exc} = 280 nm, λ_{Em} = 340 nm)

F : Forte force ionique :
KPD 0,2 M, KCl 0,5 M, EDTA 5 x 10^{-4} M, pH 7,3

f : Faible force ionique :
KPD 10^{-3} M, EDTA 5 x 10^{-4} M, pH 7,3

Lors de la détermination de la séquence de l'opérateur de l'opéron lactose en 1973, OGATA et GILBERT avaient effectué des hydrolyses DNasiques beaucoup plus rapides (1 minute avec des concentrations en DNase I beaucoup plus élevées: x 60 → x 1 000), on peut donc supposer avoir isolé des répresseurs pontés avec des polynucléotides d'environ 25 paires de bases, ce qui exclurait la possibilité d'une deuxième fixation sur le même site. Cette hypothèse se trouve confirmée lorsqu'on décompose le spectre d'absorption du complexe II isolé par filtration sur gel selon le protocole B (cf. pages 35 et 36), nous trouvons en effet une moyenne d'un répresseur pour 25,2 paires de bases ce qui correspond très exactement à la taille du site opérateur.

Ces résultats démontrent donc la présence sur le répresseur de l'opéron lactose de deux sites de fixation indépendants. En effet la proportion du second pontage est sensiblement égale à celle du premier pontage ce qui tend à démontrer que pour les interactions non spécifiques, les deux sites de fixation sont identiques et indépendants.

Ces conclusions se trouvent en accord avec les observations effectuées lors des études du complexe répresseur-opérateur, ce qui laisserait supposer que les sites d'interaction du répresseur avec les ADN opérateur et non-opérateur sont très proches l'un de l'autre ou confondus.

V - DETERMINATION DE LA REGION PONTEE PHOTOCHIMIQUEMENT

A) INTRODUCTION ET PRINCIPE

Les premiers travaux effectués pour identifier les domaines d'activité du represseur ont été réalisés par des méthodes génétiques. L'étude et la localisation d'environ 300 mutations du gène i répétoriées par PFAHL et col. (1974), ont permis de constater notamment que la plupart des mutations affectant les interactions du represseur avec les acides nucléiques se trouvaient dans la région N-terminale de la protéine et particulièrement entre les résidus 16 à 35 et 45 à 58.

Parmi tous ces travaux, les expériences effectuées par PLATT et col. (1972), GANEM et col. (1973) et FILES et col. (1974) ont présenté un intérêt particulier. Ces auteurs ont obtenu, à l'aide de mutations non sens, des represseurs auxquels manquent les 23, 42 ou 62 acides aminés de la région N-terminale. En montrant que les represseurs raccourcis ainsi obtenus ne fixaient plus l'opérateur, ces mêmes auteurs ont mis en évidence le rôle prépondérant de la région N-terminale dans les interactions acides nucléiques-represseur. L'ensemble de ces études à laissé supposer la présence de domaines d'activité distincts au sein du represseur.

Ces travaux ont été complétés à partir de 1973 par des études biochimiques. L'utilisation d'enzymes protéolytiques tels que la trypsine, la chymotrypsine ou la clostripaïne (PLATT et col., 1973 ; FILES et WEBER, 1976 ; JOVIN et col., 1977) a permis de confirmer les résultats obtenus par les méthodes génétiques.

Des expériences plus récentes utilisant des méthodes enzymatiques analogues(GEISLER et WEBER , 1977, 1978) ont abouti à l'isolement de la région N-terminale de 51 acides aminés. En démontrant que le "peptide HP" ainsi isolé était capable de se complexer avec des ADN opérateur et non-opérateur, ces mêmes auteurs ont donné une nouvelle orientation aux recherches sur les interactions acides nucléiques-represseur.

Ce sont ces techniques biochimiques utilisant des enzymes protéolytiques que nous avons appliquées pour tenter de localiser le pontage photochimique ADN BrU-répresseur.

Pour toutes ces expériences, les protocoles de préparation et d'isolement du complexe ponté sont les mêmes que ceux décrits dans le paragraphe III A, les conditions d'irradiation étant celles déterminées à l'issue des études sur le complexe ponté ADN BrU-répresseur décrites dans le chapitre III.

Les complexes ainsi préparés et isolés sont dialysés contre le tampon d'hydrolyse avant chaque expérience.

B) HYDROLYSE TRYPSIQUE DU COMPLEXE PONTE

1) Hydrolyse limitante

L'hydrolyse trypsique est effectuée selon le procédé décrit par GEISLER et WEBER (1977, 1978) dans du tampon Tris-HCl 1 M, glycerol 30 %, pH 7,5 à 25°C. Ce procédé permet l'hydrolyse du répresseur au niveau des acides aminés 51 et 59 et la conservation de la région N-terminale intacte.

Des cinétiques d'hydrolyse du répresseur ponté effectuées dans ces conditions ont montré que la protéolyse était lente et incomplète. Pour des temps d'hydrolyse de 48 heures, avec des concentrations initiales en trypsine de 1 % et ajustées à 2 % en cours d'expérience, nous ne sommes pas parvenu à hydrolyser totalement le répresseur ponté : 40 % de la fluorescence du tryptophane, spécifique du "corps" trypsique est trouvée sur l'ADN lors d'une nouvelle séparation sur Sepharose 6B. La lenteur de cette hydrolyse démontre que l'accessibilité des sites 51 et 59 est plus faible que lors de la même hydrolyse effectuée sur du répresseur libre. Le pontage photochimique induit donc des contraintes qui peuvent diminuer l'accessibilité des sites trypsiques soit par un changement de conformation local au niveau du "peptide HP", soit par un encombrement stérique dû à la présence de l'ADN à proximité du site de clivage.

Dans ces conditions d'hydrolyse, le "corps" demeure intact (vérifié par électrophorèse en SDS), cela peut donc signifier que le pontage se situe au niveau de la région N-terminale et que l'hydrolyse est incomplète pour les raisons invoquées ci-dessus. Cela peut vouloir dire également qu'il existe au moins deux sites de pontage, l'un d'entre eux se trouvant sur la région N-terminale et l'autre au niveau du "corps" trypsique.

Nous avons modifié les conditions expérimentales pour lever cette ambiguité.

2) Hydrolyse non limitante

Les hydrolyses sont effectuées dans du tampon NH_4HCO_3 0,1 M à 25°C selon le procédé décrit par FILES et WEBER (1976). Dans ces conditions, le "corps" trypsique demeure intact, mais les "peptides HP" sont totalement hydrolysés ainsi que les peptides C-terminaux (341-360) pour des temps d'hydrolyses supérieurs à 40 minutes (PLATT et col., 1973; FILES et WEBER, 1976).

Les principaux résultats de cette étude sont résumés dans le tableau suivant :

Temps d'hydrolyse 25°C	Tamisage moléculaire % répresseur hydrolysé	Electrophorèse SDS
40 mn	93	"corps" intact + traces de "corps" tronqué
4 h	> 99	Traces de "corps" + "corps" tronqué

Tableau I : Hydrolyse trypsique limitante du répresseur, résumé des résultats observés après tamisage moléculaire et électrophorèse en SDS. "corps" : domaine 60-360; "corps" tronqué : domaine 60-340

L'électrophorèse en SDS (photo a) nous permet d'identifier avec précision les produits d'hydrolyse du répresseur ponté en les comparant aux hydrolysats du répresseur libre pour des temps identiques.

r	r	r	p	p	p	p	substrat
0 mn	40 mn	4 h	0 mn	10 mn	40 mn	4 h	Temps d'hydrolyse

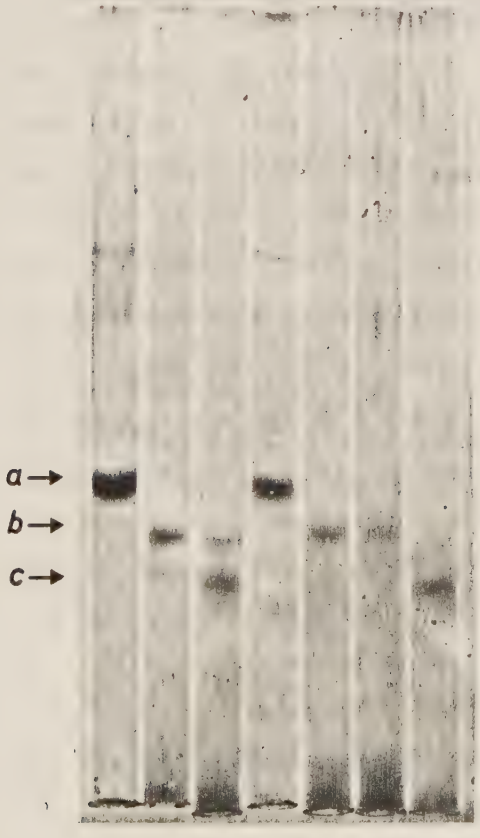


Photo a

. Cinétique d'hydrolyse trypsique des répresseurs libres et pontés. (Tampon $NH_4 HCO_3$ 0,1 M, 25°C) Electrophorèse en SDS 1%, tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,25.

. r : répresseur libre

. p : répresseur ponté

. a : protomère intact

. b : "corps" trypsique

. c : "corps" tronqué

Ces résultats nous permettent donc d'affirmer que le "corps" tronqué (résidus 60 à 340) n'est pas impliqué dans le pontage photochimique du répresseur avec l'ADN BrU.

Cependant, ces conditions expérimentales ne nous permettent pas d'exclure avec certitude la possibilité d'un pontage partiel au niveau de la région C-terminale. Il reste en effet 7 % de "corps" fixé sur l'ADN au moment où les peptides C-terminaux sont à leur tour hydrolysés. D'autre part, nous ne pouvons exclure que le pentapeptide C terminal soit hydrolysé dès le début de la cinétique d'hydrolyse, la détection d'un "corps" très légèrement tronqué (1,5 %) n'étant pas détectable par électrophorèse. Pour tenter d'écarter ces dernières incertitudes, nous allons utiliser une enzyme différente par sa spécificité : la chymotrypsine.

C) HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DU COMPLEXE PONTE

L'hydrolyse limitante du répresseur par la chymotrypsine (Tris HCl 1 M, glycerol 30 %, pH 7,5) permet l'isolement du peptide N-terminal (1-56) sans hydrolyse du "corps" et de la région C-terminale (GEISLER et WEBER, 1978).

Après différents essais, nous avons constaté que l'hydrolyse chymotrypsique quoique plus rapide que la trypsinolyse demeurait très lente. Nous avons donc procédé à des hydrolyses de 14 heures en ajoutant progressivement l'enzyme jusqu'à une concentration finale de 2 % (m/m), les réactions étant arrêtées par addition de PMSF (10 %) avant séparation des hydrolysats par tamisage moléculaire sur Sepharose 6B. Le "corps" chymotrypsique étant caractérisé par fluorescence dans la bande d'émission du tryptophane, l'analyse des éluats par cette méthode nous a permis de conclure que 97 % au moins des répresseurs avaient été protéolysés.

Pour contrôler ce résultat, il nous fallait vérifier que l'hydrolyse limitante du répresseur par la chymotrypsine n'induisait pas une protéolyse du "corps" dans la région C-terminale pour des temps de réaction élevés (14 heures) et que les produits de dégradation enzymatique du répresseur ponté étaient les mêmes que ceux obtenus après l'hydrolyse du répresseur libre.

Nous avons effectué ces vérifications par électrophorèse en SDS en hydrolysant en parallèle des répresseurs libres et pontés dans des tampons Tris 1 M, glycerol 30 % pH 7,5 et carbonate d'ammonium 0,1 M.

L'observation des résultats d'électrophorèse (cf photo b) nous montre qu'à l'inverse des hydrolyses effectuées dans le deuxième tampon, aucune protéolyse de la région C-terminale n'est observée pour les répresseurs pontés et libres hydrolysés dans les conditions limitantes.

La présence de "peptides HP" intacts lors de l'hydrolyse dans le tampon Tris-HCl en présence de glycerol nous confirme que la trypsinolyse s'est effectuée sans destruction du domaine N terminal.

C	C	C	C	C	C	T	T		T	T	T	Tampon d'hydrolyse
r	p	r	p	r	p	r	p		p	r	p	Substrat
0 mn	0 mn	40 mn	40 mn	4 h	4 h	0 mn	0 mn	X	40 mn	14 h	14 h	Temps d'hydrolyse

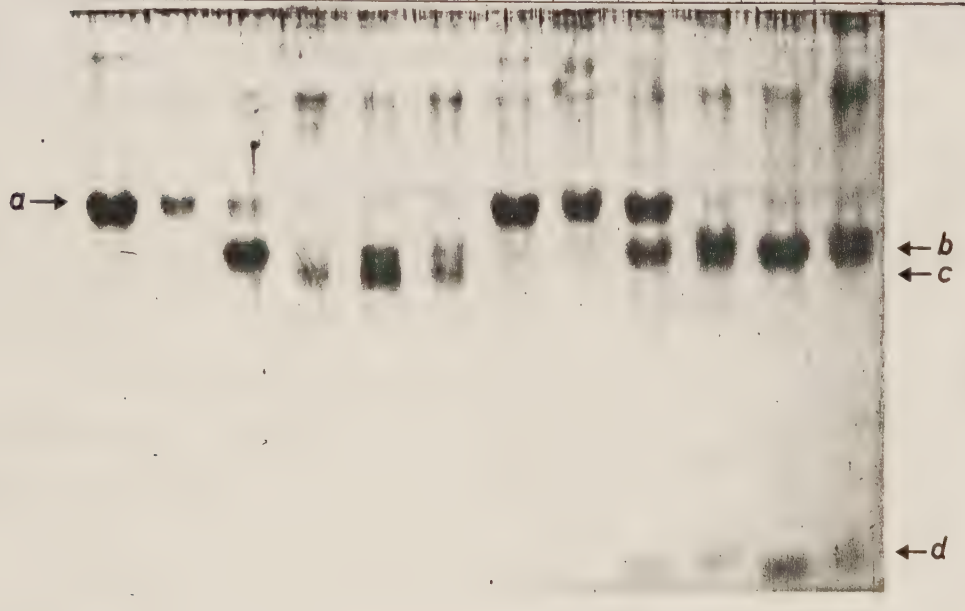


Photo b

. Cinétique d'hydrolyse chymotrypsique du répresseur à 25°C
Electrophorèse en SDS 1 %, tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,25

. C : Hydrolyse dans du tampon carbonate d'ammonium 0,1 M
. T : Hydrolyse dans du tampon Tris-HCl 1 M, pH 8,5, glycerol 30 %
. r : Répresseur libre
. p : Répresseur ponté
. X : Mélange de protomère intact et de "corps" chymotrypsique
. a : Protomère intact . b : "corps" chymotrypsique
. c : "corps" chymotrypsique tronqué . d : "peptide HP" intact

Nous pouvons donc conclure que le pontage photochimique ADN BrU-répresseur est localisé dans la seule région N terminale de la protéine et plus exactement entre les résidus 1 et 56, site de clivage de la chymotrypsine.

En cela nos résultats confirment le rôle prépondérant de ce domaine dans les intéractions avec les acides nucléiques? Sur la base de ces résultats, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'induire un pontage photochimique entre le "peptide HP" isolé et l'ADN BrU pour nous permettre une étude plus fine du système.

VI PONTAGE PHOTOCHIMIQUE DE LA REGION N TERMINALE DU REPRESSEUR AVEC L'ADN BrU

A) INTRODUCTION

A la suite des travaux qui avaient abouti à la séparation et à l'isolement des domaines du répresseur (GEISLER et WEBER, 1977, 1978), des études physicochimiques avaient été entreprises pour vérifier que le "corps" trypsique et le "peptide HP" possédaient la même structure que dans le répresseur natif.

Des expériences comparatives effectuées sur le "corps" trypsique et sur le répresseur ont pu démontrer, en étudiant la fixation des effecteurs par dichroïsme circulaire, que la structure locale du site de fixation demeurait inchangée (MAURIZOT et CHARLIER, 1977).

De même, des travaux effectués en RMN protonique (^{1}H RMN) ou du fluor (^{19}F RMN) ont montré, en observant les déplacements chimiques des tyrosines que la structure du "peptide HP" n'était pas modifié (BUCK et col., 1978; WADE-JARDETZKY et col., 1979).

Du fait de ces résultats, l'étude des intéraction du "peptide HP" avec les acides nucléiques a pris un intérêt nouveau et la question de savoir si le "peptide HP" isolé ou intégré au répresseur interagissait pareillement avec les acides nucléiques a été posée.

C'est dans cette optique que nous avons envisagé de ponter photochimiquement le "peptide HP" à l'ADN BrU. Si cette expérience s'avérait positive, l'identification du peptide ponté s'en trouverait facilitée.

B) RESULTATS

1) Préparation du complexe

Le "peptide HP" a été préparé au laboratoire et caractérisé selon les methodes décrites dans le chapitre II C.

Le complexe ADN BrU-"peptide HP" a été préparé selon le même procédé que celui décrit lors de l'étude du répresseur. Les concentrations en "peptide HP" et en ADN BrU utilisées pour cette étude sont les suivantes :

1 "peptide HP"/ 6 p.d.b. { ADN : 2,1 x 10^{-7} M en p.d.b. ; "peptide HP" : 3,5 x 10^{-8} M

Après la formation du complexe par dialyse, les concentrations en "peptides HP" ont été redéterminées par décomposition du spectre d'absorption. Cette vérification est rendue nécessaire car les "peptides HP" ont tendance à traverser la membrane lors de la dialyse. Des proportions de 1 "peptide HP" pour 7 à 8 paires de bases selon les expériences ont ainsi été évaluées.

2) Mise en évidence du complexe

Comme lors de l'étude sur le répresseur, le complexe ADN BrU-"peptide HP" a été caractérisé par dichroïsme circulaire. Le changement de conformation de l'ADN BrU observé lors de la fixation est qualitativement le même que celui que nous observons lors des intéractions ADN BrU-répresseur (cf figures III_1 et VI_1). Ces résultats confirment ceux obtenus par SCHNARR (1982) lors de l'étude de complexes entre le "peptide HP" et différents ADN non opérateurs.

3) Expérience de pontage photochimique

Pour cette étude, nous avons utilisé les mêmes conditions d'irradiation que celles déterminées lors de l'étude sur le répresseur (cf chapitre III).

Pour séparer les "peptides HP" libres et pontés, nous nous sommes servis de la même technique de tamisage moléculaire sur Sepharose 6B. Les éluats sont analysés par spectrophotométrie d'absorption et par fluorescence. Pour cette dernière technique, nous avons excité les chromophores à 270 ou 280 nm et enregistré l'émission de fluorescence à 310 ou 315 nm. En effet, bien que le spectre d'émission de fluorescence du "peptide HP" présente un maximum à 305 nm caractéristique de l'émission de la tyrosine, les enregistrements ont été faits à des longueurs d'ondes légèrement supérieures pour limiter les erreurs pouvant provenir du spectre de diffusion de l'ADN BrU et du spectre Raman de l'eau.

Les différents résultats obtenus par cette méthode sont résumés dans le tableau VI_2.

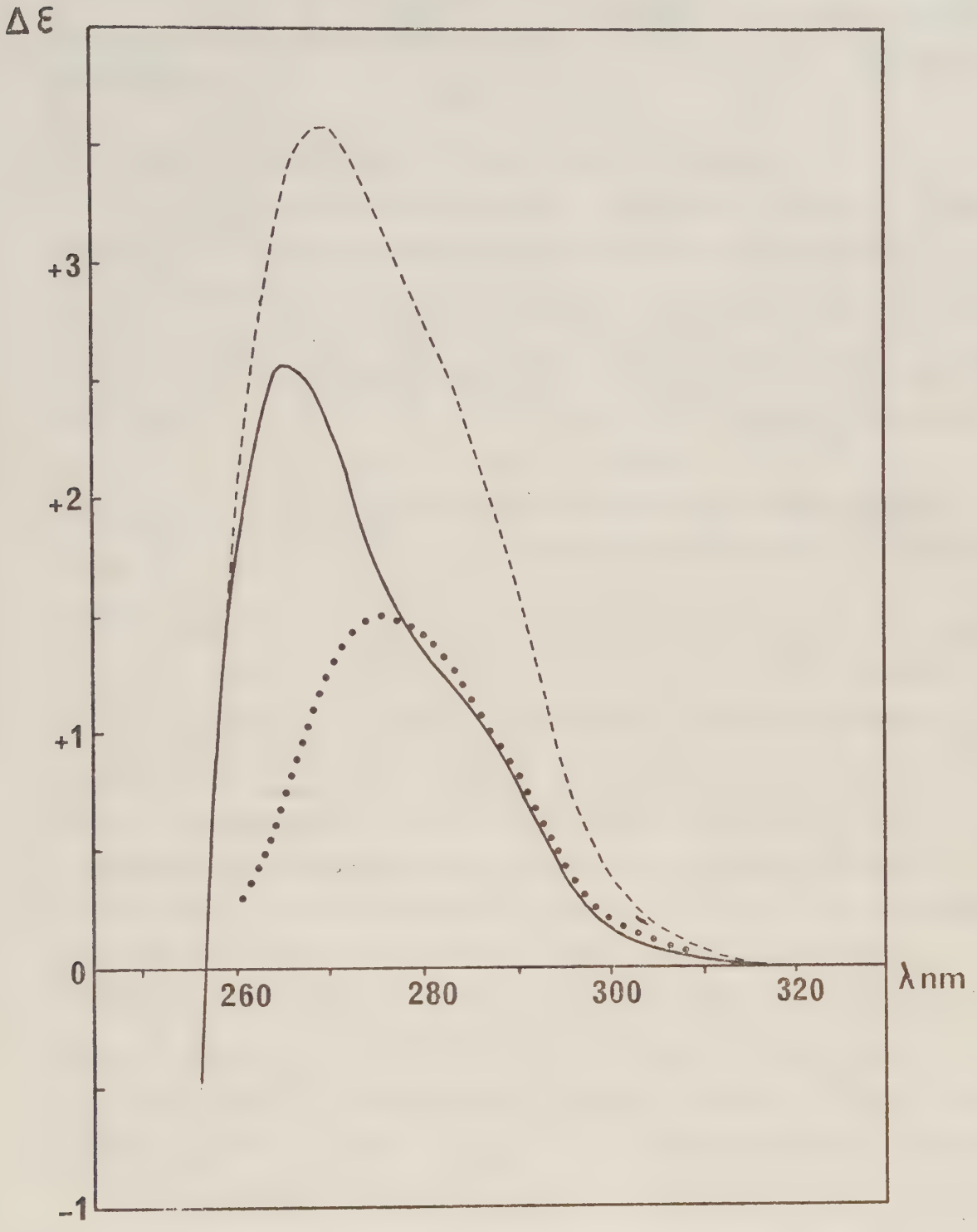


Figure VI_1 : Spectres de dichroïsme circulaire du complexe ADN BrU-"peptide HP" (1 "peptide HP"/ 8 p.d.b.) à faible force ionique (KPD 10^{-3} M) : -----, et à forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M) : ———.
Le tracé .... représente le spectre différence entre les complexes à faible et forte force ionique.

Irradiation	Elution	% "peptide HP" complexé	% "peptide HP" libre	Conclusion
F	F	0	100	Pas de complexe donc pas de pontage.
X	f	100	0	"peptide HP" totalement complexé.
f	F	0	100	Pas de pontage

Tableau VI_2 : Pontage photochimique "peptide HP"-ADN BrU, analyse des résultats par fluorescence après tamisage moléculaire. F = forte force ionique (KPD 0,2 M, KCl 0,5 M); f = faible force ionique (KPD 10^{-3}M).

Cette expérience renouvelée plusieur fois semble démontrer que le "peptide HP" n'est pas ponté photochimiquement à l'ADN BrU. Cependant, les travaux de CULARD et col. (1983) ayant montré que lorsque le "peptide HP" est complexé à l'ADN, 60 % de la fluorescence dûe aux tyrosines est inhibée, un certain nombre de vérifications ont été effectuées.

Nous avons testé la sensibilité de la méthode en observant l'émission de fluorescence de complexes entre de l'ADN BrU et des "peptides HP" rajoutés à différentes concentrations. Ce procédé nous a permis de vérifier que dans les conditions expérimentales utilisées lors de l'expérience de pontage photochimique, des proportions de 1 à 2 % de "peptides HP" pontés auraient été détectées.

Dans l'hypothèse ou le pontage photochimique inhiberait totalement la fluorescence des tyrosines, d'autres vérifications ont été entreprises.

Nous avons donc comparé la somme de la fluorescence des "peptides HP" des différentes fractions obtenues après tamisage moléculaire pour les irradiations effectuées à faible et à forte force ionique. Malgré l'imprécision de la méthode, nous avons ainsi déterminé un pourcentage de "peptides HP" ponté d'environ 7 %.

En décomposant le spectre d'absorption de l'ADN après passage sur Sepharose 6B des complexes irradiés à faible et forte force ionique, des valeurs analogues ont été trouvées (< 10 %).

4) Conclusion

Quelles que soient les méthodes utilisées pour évaluer la proportion de "peptides HP" pontés à l'ADN, cette valeur ne peut en aucun cas être supérieure à 10 %. Ces résultats peuvent être interprétés de deux façons :

. Le pontage photochimique du "peptide HP" est impossible.
. Un très faible pourcentage de pontages est réalisé, ceux-ci s'accompagnant d'une inhibition totale de la fluorescence des tyrosines.

Si les résultats ne nous permettent pas de trancher formellement entre ces deux hypothèses, nous pouvons néanmoins tenter de les expliquer. Un pourcentage de pontages photochimiques très faible ou nul signifie que la géométrie d'action du "peptide HP" libre avec l'ADN BrU est différente de celle que nous observons lors des intéractions ADN-répresseur. Ainsi, à l'inverse du répresseur, les groupements interagissant entre eux ne permettent pas le pontage photochimique du "peptide HP" à l'ADN BrU.

Lors de l'intéraction non-spécifique, le "peptide HP" se fixe sur un site d'environ 3 paires de bases et 3 paires d'ions au maximum sont formées au cours de l'intéraction (SCHNARR, 1982). Dans des conditions analogues, la longueur du site de fixation du répresseur est d'environ 15 paires de bases (BUTLER et col., 1977; DURAND et MAURIZOT, 1980) et 12 ± 2 paires d'ions sont alors formées. Ces résultats nous incitent à penser que le répresseur interagit avec l'ADN par l'intermédiaire de ses quatre "peptides HP". Cependant, les constantes d'association pour le "peptide HP" (SCHNARR, 1982) et pour le répresseur mesurées pour une force ionique de 0,1 M en NaCl ($K_{aHP} = 10^3\ M^{-1}$ et $K_{aRep} = 10^7\ M^{-1}$) n'obéissent pas à la relation $K_{aRep} = K_{aHP}^4$ que l'on devrait trouver dans une telle hypothèse. Le fait que le "peptide HP" libre adopte une géométrie d'interaction particulière lors de son intéraction avec l'ADN pourrait expliquer ces observations contradictoires.

Le "corps" trypsique pourrait donc intervenir en limitant la mobilité des "peptides HP" ou en leur imposant une géométrie d'interaction privilégiée vis-à-vis de l'ADN. Si les expériences effectuées nous amènent à envisager l'intervention du "corps" dans les intéractions non-spécifiques, elles ne nous permettent cependant pas de conclure précisément sous quelle forme ce domaine pourrait intervenir.

VII - EVALUATION DU NOMBRE DE PROTOMERES EN CONTACT AVEC L'ADN LORS DES INTERACTIONS NON SPECIFIQUES

A) PRINCIPE

Nous avons pu montrer dans le chapitre IV que le répresseur possédait deux sites distincts pour la fixation non-spécifique en accord avec les résultats obtenus par O' GORMAN et col. (1980) et CULARD et MAURIZOT (1982) lors d'études analogues sur les intéractions du répresseur avec la séquence opérateur. Deux types de modèles ont été proposés, l'un faisant intervenir deux "peptides HP" par site (CHARLIER et col., 1981; Mc KAY et col., 1982), l'autre faisant intervenir deux fois les quatre "peptides HP" (DUNAWAY et col., 1980) (voir la représentation graphique des différents modèles page 6).

Des arguments en faveur du premier modèle s'appuient sur des mesures de paramètres structuraux (CHARLIER et col., 1981) et la détermination de deux "peptides HP" par opérateur dans l'intéraction répresseur-opérateur suivie en dichroïsme circulaire (CULARD et col., 1983).

Des arguments en faveur du second modèle viennent de mesures de constantes d'association entre l'opérateur et des répresseurs hybrides partiellement trypsinés (DUNAWAY et MATTHEWS, 1980). En outre, CLEMENT et DAUNE (communication personnelle) ont observé que les quatre "peptides HP" étaient protégés de façon identique contre la trypsination lorsque le répresseur était complexé au poly d(A-T). Enfin, NICK et col. (1982a) ont observé par RMN du fluor (^{19}F RMN) que les quatre "peptides HP" du répresseur substitué à la fluorotyrosine sont immobilisés lors de la formation du complexe avec l'opérateur.

Enfin, SCHNARR (1982) a observé que la seule fixation de deux "peptides HP" n'était pas suffisante pour expliquer la longueur du site et le nombre de paires d'ions formées lors des intéractions ADN-répresseur (cf page 49).

Nous avons pour notre part tenté de déterminer le nombre de protomères protégés contre les protéases sur du répresseur ponté à l'ADN BrU.

B) METHODOLOGIE

Nous avons pu observer dans le chapitre V que l'hydrolyse à forte force ionique du répresseur ponté était sensiblement plus lente

que celle du répresseur libre, il semble donc y avoir une protection du protomère ponté contre les dégradations enzymatiques. Des protomères non pontés sont-ils également protégés dans ces conditions expérimentales ? Cela est peu probable, et ce pour deux raisons :

Ces expériences d'électrophorèse ayant été effectuées dans un gel de 7,5 % en acrylamide, seuls le ou les protomères pontés photochimiquement sont retenu au niveau du gel de concentration du fait de la masse moléculaire élevée de l'ADN auquel ils sont accrochés. Or, dans ces expériences, les électrophorèses ne révèlent la présence d'aucun protomère intact lors d'hydrolyses incomplètes du répresseur ponté, ce qui signifie que les seuls protomères éventuellement protégés sont ceux qui sont restés pontés à l'ADN.

Deuxièmement, lors de la mise en évidence du répresseur ponté, nous avons vérifié que le spectre dichroïque de l'ADN BrU sur lequel est ponté le répresseur est, mesuré à forte force ionique, pratiquement identique à celui de l'ADN BrU libre irradié dans les mêmes conditions. Ceci semble démontrer qu'à forte force ionique l'intéraction entre le répresseur et l'ADN BrU est très faible et que le seul contact entre eux est constitué par la liaison covalente issue du pontage photochimique. Dans ces conditions, la possibilité que des protomères non pontés soient également protégés contre la dégradation enzymatique semble peu probable.

D'autre part, des cinétiques d'hydrolyse du complexe répresseur-ADN BrU effectuées à faible force ionique (KPD 10^{-3} M, pH 7,3) montrent que celles-ci sont très rapides (photos a et c), la protéolyse d'un protomère entraînant probablement une déstabilisation du complexe et donc une attaque plus facile du répresseur. Ces résultats semblent confirmer les travaux de DUNAWAY et MATTHEWS (1980) sur des répresseurs hybrides possédant de 0 à 4 "peptides HP", qui montrent que les constantes de dissociation de complexes ADN-répresseur sont d'autant plus importantes que le nombre de protomères natifs est faible.

En hydrolysant à faible force ionique le complexe ponté, nous pouvons espérer que le pontage photochimique stabilise la structure du complexe et permette ainsi la protection d'un ou plusieurs protomères contre la dégradation protéolytique.

Pour réaliser cette expérience, nous avons préparé et isolé le complexe ponté selon les procédés décrits précédement. Après élimination à forte force ionique des répresseurs non pontés, le complexe a été dialysé pendant 40 heures à faible force ionique contre du tampon KPD 10^{-3} M, pH 7,3 pour permettre la réassociation du répresseur avec l'ADN BrU.

Après avoir contrôlé la formation du complexe par dichroïsme circulaire, nous avons effectué les cinétiques d'hydrolyse à 25°C en utilisant des concentrations de 1 % (m/m) en trypsine ou en chymotrypsine. Les hydrolyses ont été effectuées sur deux fractions identiques dans du tampon KPD 10^{-3} M, pH 7,3, l'une d'elle étant ajustée à 0,1 M en carbonate d'ammonium après 40 minutes d'hydrolyse.

Les hydrolyses témoins ont été effectuées sur du complexe non ponté en respectant scrupuleusement le procédé décrit ci-dessus.

Après électrophorèse et coloration des gels, l'intensité des bandes révélées au bleu de coomassie est mesurée au microdensitomètre. Les surfaces mesurées sont ensuite normées en tenant compte de la taille des fragments protéiques révélés.

L'hydrolyse trypsique a également fait l'objet d'un contôle supplémentaire par dichroïsme circulaire.

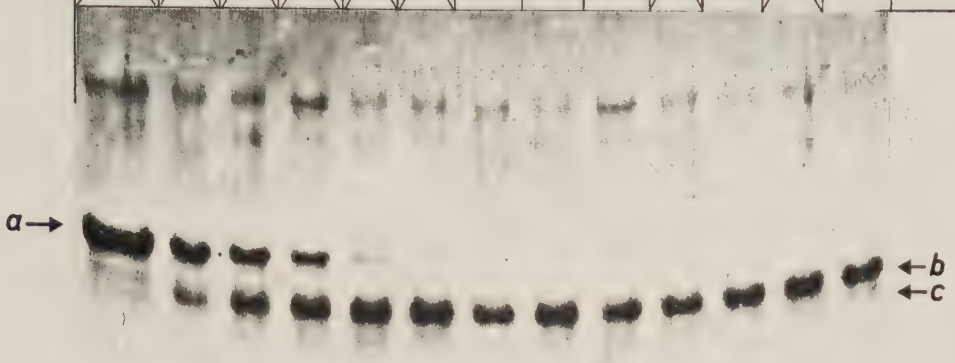
C) RESULTATS

1) Hydrolyse chymotrypsique

L'observation des témoins (photo a) nous montre que la protéolyse du complexe non ponté est rapide et complète. Cette hydrolyse, terminée avant 40 minutes se fait sans dégradation intermédiaire de la région N terminale, aucune trace de "corps" intermédiaire n'est en effet détectable Cependant, pour des temps d'hydrolyse plus importants, nous constatons une dégradation du "corps" chymotrypsique dans la partie C terminale (FILES et WEBER, 1976) ce qui se traduit par l'apparition de "corps" tronqué.

La cinétique d'hydrolyse du répresseur ponté photochimiquement est toute différente (photo b, courbe VII_1), la protéolyse du répresseur est alors beaucoup plus lente et demeure incomplète après 80 minutes d'hydrolyse. Aucune trace de "corps" intermédiaire n'est également détectée.

K 0'	K 2'	K 5'	K 10'	K 20'	K 40'	K 40'	K 40'	K 40'	K 60'	K 40'	K 80'	K 40'	Hydrolyse N°1
X	X	X	X	X	X	C 2'	C 5'	C 10'	X	C 20'	X	C 40'	Hydrolyse N°2



a : Protomère intact

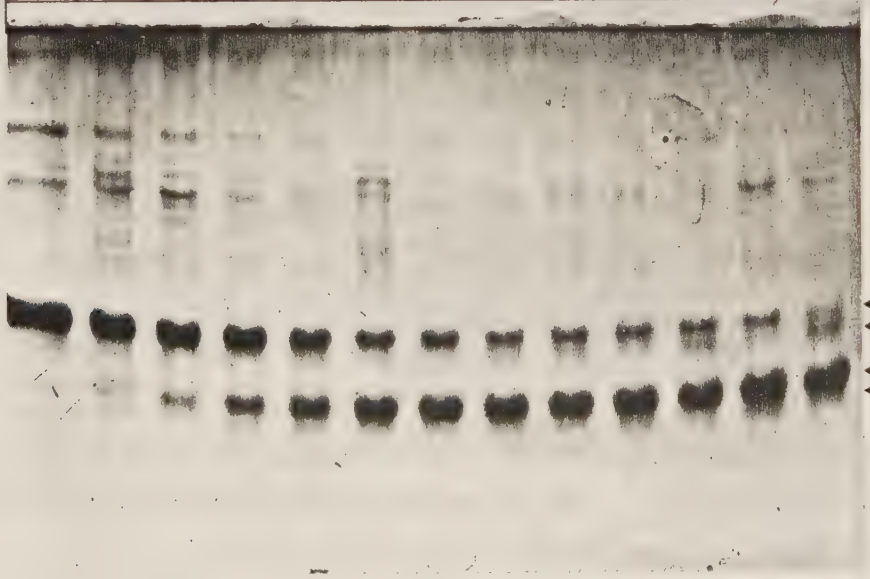
b : "corps" chymotrypsique

c : "corps" chymotrypsique tronqué

Photo a

. Cinétique d'hydrolyse chymotrypsique à 25°C du complexe répresseur-ADN BrU non ponté.
. Electrophorèse en SDS 1 %, tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,25.
. K : Tampon KPD 10^{-3} M, pH 7,3 . C : Tampon carbonate d'ammonium 0,1 M
. Les temps d'hydrolyse sont exprimés en minutes.

K 0'	K 2'	K 5'	K 10'	K 20'	K 40'	K 40'	K 40'	K 40'	K 60'	K 40'	K 80'	K 40'	Hydrolyse N°1
X	X	X	X	X	X	C 2'	C 5'	C 10'	X	C 20'	X	C 40'	Hydrolyse N°2



a : Protomère intact

b : "corps" chymotrypsique intermédiaire

c : "corps" chymotrypsique

d : "corps" chymotrypsique tronqué

Photo b

. Cinétique d'hydrolyse chymotrypsique à 25°C du complexe répresseur-ADN BrU ponté.
. Electrophorèse en SDS 1 %, tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,25.
. K : Tampon KPD 10^{-3} M, pH 7,3 . C : Tampon carbonate d'ammonium 0,1 M
. Les temps d'hydrolyse sont exprimés en minutes.

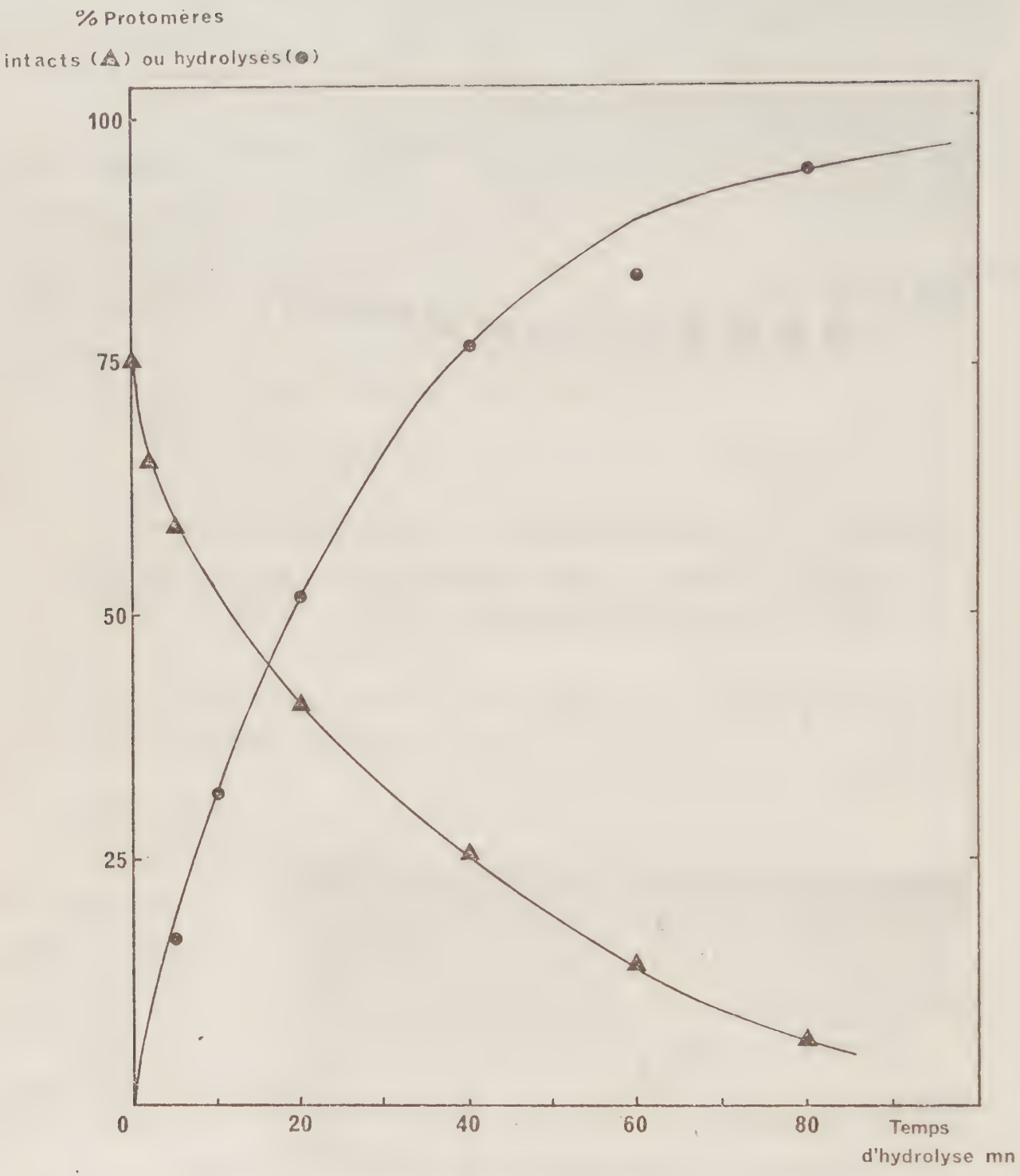


Figure VII$_1$: Cinétique d'hydrolyse chymotrypsique à faible force ionique (KPD 10^{-3}M) du complexe ponté represseur-ADN BrU à partir des résultats d'électrophorèse.

Si l'addition de carbonate d'ammonium ne provoque aucune modification réellement significative de la cinétique d'hydrolyse, elle permet en revanche la protéolyse de la région N-terminale du represseur et se traduit par l'apparition de "corps" rallongé. En étudiant la mobilité de celui-ci par rapport à des témoins de poids moléculaire connu tels le represseur natif et le "corps" trypsique, nous pouvons conclure que la première hydrolyse se fait au niveau de la tyrosine 12 sans que nous puissions exclure la possibilité de clivages en 51 ou 59.

La cinétique d'hydrolyse du represseur ponté (figure VII 1) bien que difficile à interpréter nous permet cependant une observation. Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe précédant, les protomères pontés, retenus par l'ADN, ne pénètrent pas dans le gel. Au temps t = 0, seuls sont donc détectables les protomères libres. A l'inverse, à la fin de l'expérience, la presque totalité des protomères sont hydrolysés (vérifié par tamisage moléculaire) et pénètrent dans le gel. En considérant que les protomères révélés à la fin de l'expérience représentent la totalité du matériel de départ, nous constatons qu'environ 25 % des protomères sont retenus sur l'ADN au temps t = 0, ce qui signifie que le represseur est ponté à l'ADN par l'intermédiaire d'un seul protomère.

2) Hydrolyse trypsique

La trypsinolyse du complexe non ponté (photo VII c) nous permet de tirer les mêmes conclusions que lors de l'hydrolyse chymotrypsique. On peut toutefois remarquer que la cinétique d'hydrolyse est plus rapide puisque la totalité des protomères sont hydrolysés au bout de 20 mn.

L'hydrolyse du represseur ponté est quand à elle beaucoup plus intéressante. Quand nous observons les résultats des électrophorèses, (photo d, figure VII_2) nous constatons trois faits importants : la trypsinolyse du represseur s'apparente dans l'intervalle de temps de l'expérience à une cinétique d'ordre 0, l'hydrolyse du represseur est lente et incomplète, et le passage en carbonate d'ammonium 0,1 M accélère la réaction et permet l'hydrolyse de la totalité des protomères.

Lors de cette protéolyse en carbonate d'ammonium, nous notons l'apparition de "corps" rallongé, non décelable à faible force ionique, et

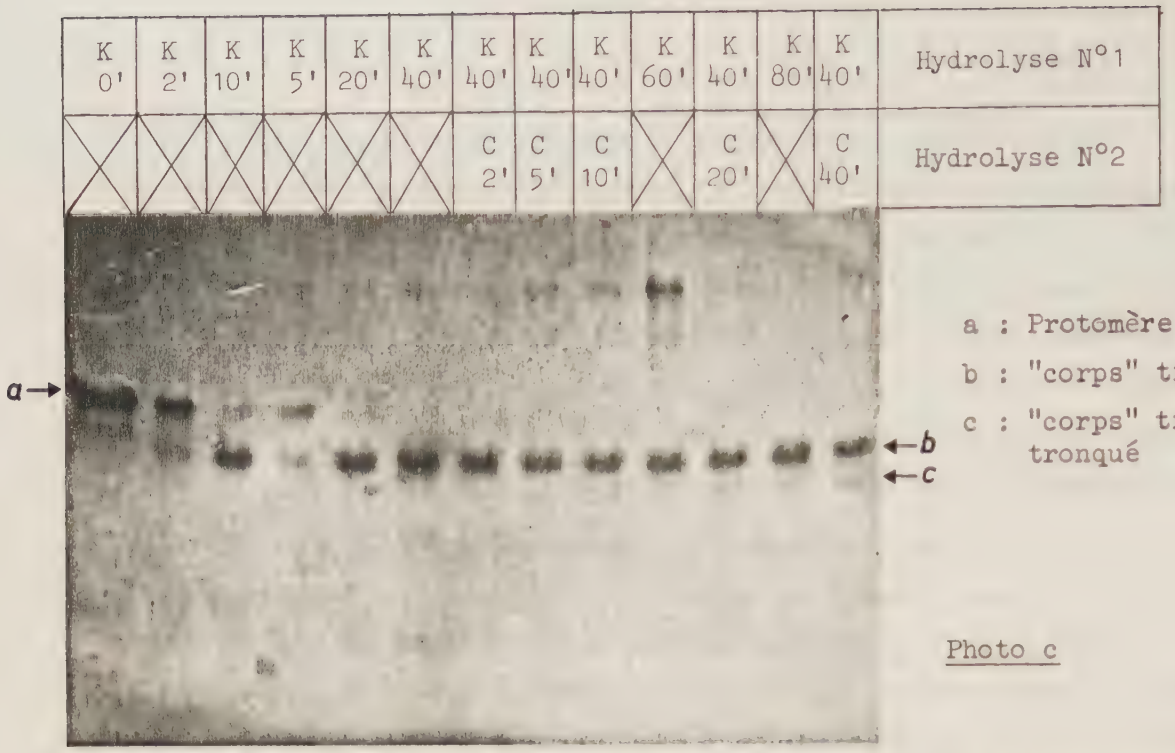


Photo c

. Cinétique d'hydrolyse trypsique à 25°C du complexe ADN BrU-répresseur non ponté.
. Electrophorèse en SDS 1 %, tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,25.
. C : Tampon carbonate d'ammonium 0,1 M . K : Tampon KPD 10^{-3} M
. Les temps d'hydrolyse sont exprimés en minutes.

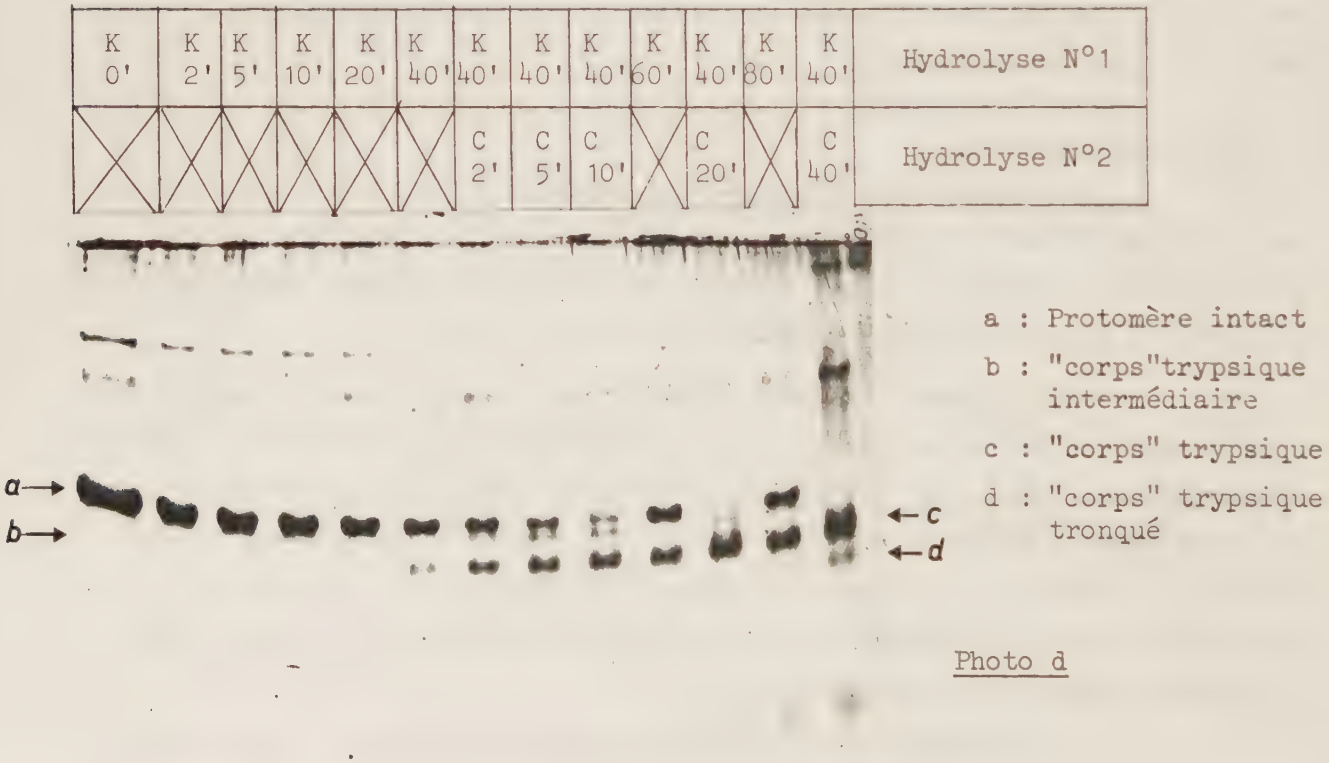


Photo d

. Cinétique d'hydrolyse trypsique à 25°C du complexe ADN BrU-répresseur ponté.
. Electrophorèse en SDS 1 %, tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,25.
. C : Tampon carbonate d'ammonium 0,1 M . K : Tampon KPD 10^{-3} M
. Les temps d'hydrolyse sont exprimés en minutes.

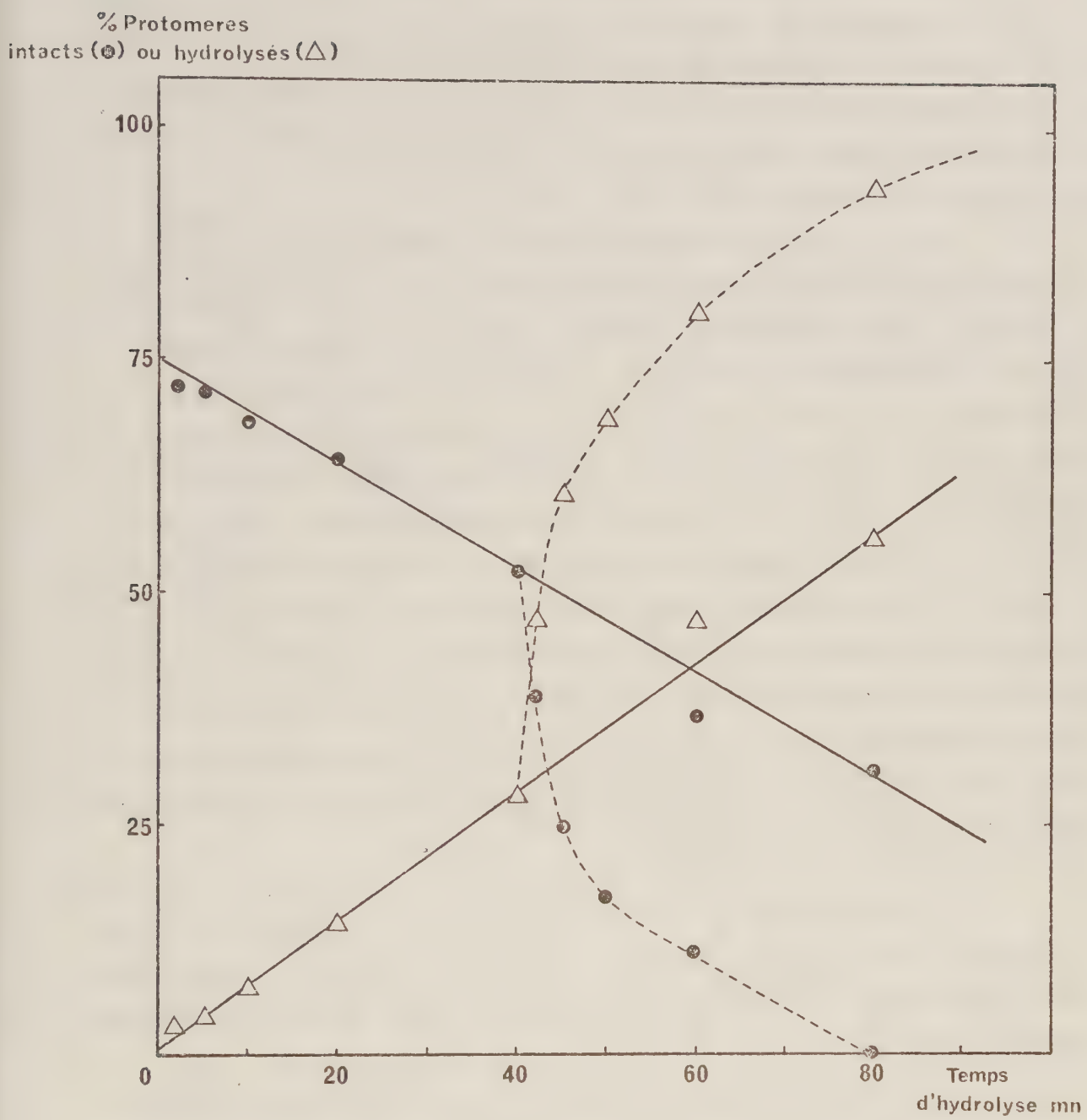


Figure VII_2 : Cinétique d'hydrolyse trypsique du complexe ponté represseur-ADN BrU à partir des résultats d'électrophorèse.

——— : hydrolyse à faible force ionique (KPD 10^{-3}M)

----- : hydrolyse en carbonate d'ammonium 0,1 M à partir de t = 40 mn.

dont la mobilité nous permet de conclure que le clivage se situe cette fois-ci au niveau de l'arginine 22. Comme lors de l'expérience précédente, nous avons vérifié que seul un protomère sur 4 est ponté à l'ADN (cf figure VII 2). Nous allons maintenant analyser la cinétique d'hydrolyse du represseur ponté et voir dans quelle mesure nos résultats sont compatibles avec l'une ou l'autre des deux possibilités mentionnées dans l'introduction.

Si nous supposons que la fixation du represseur se fait par l'intermédiaire de deux protomères, nous devons alors observer deux types de cinétiques : tout d'abord une hydrolyse rapide où les deux protomères non complexés à l'ADN seraient tryspinés, superposée à une cinétique lente ou les protomères en contact avec l'ADN seraient à leur tour hydrolysés. Or l'expérience nous montre que la seule cinétique observée est celle d'une hydrolyse lente. Alors qu'après 15 ou 20 mn, 50 % au moins des "peptides HP" auraient dû être libérés , ce résultat n'est obtenu qu'après 70 mn d'hydrolyse. Nous sommes donc amenés, pour expliquer ce résultat, à considérer que la fixation du represseur sur l'ADN protège la totalité des protomères contre l'action de la trypsine ce qui semble contradictoire avec la présence de deux sites de fixation impliquant chacun deux "peptides HP" sur le répresseur Cette cinétique d'ordre 0 dans un intervalle de temps relativement grand (80 mn) dans nos conditions expérimentales, semble également montrer que la vitesse de protéolyse est sensiblement la même pour les quatre "peptides HP" dans nos conditions expérimentales.

Pour confirmer ceci, nous avons suivi la protéolyse du represseur en observant par dichroïsme circulaire son relargage du complexe ADN-represseur. L'hydrolyse a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment à partir d'un complexe fraichement préparé et irradié. Pour cette expérience, des proportions d'un répresseur pour 25 paires de bases ont été utilisées. Aucune séparation des represseurs libres et pontés n'a été effectuée avant l'hydrolyse pour nous permettre de disposer avec le même échantillon des cinétiques d'hydrolyse des represseurs libres et pontés dans des conditions strictement identiques.

La courbe d'hydrolyse obtenue comporte trois phases distinctes. Nous observons tout d'abord une phase de protéolyse rapide où environ 35 % des represseurs sont hydrolysés. Ceci correspond à la proportion de repres-

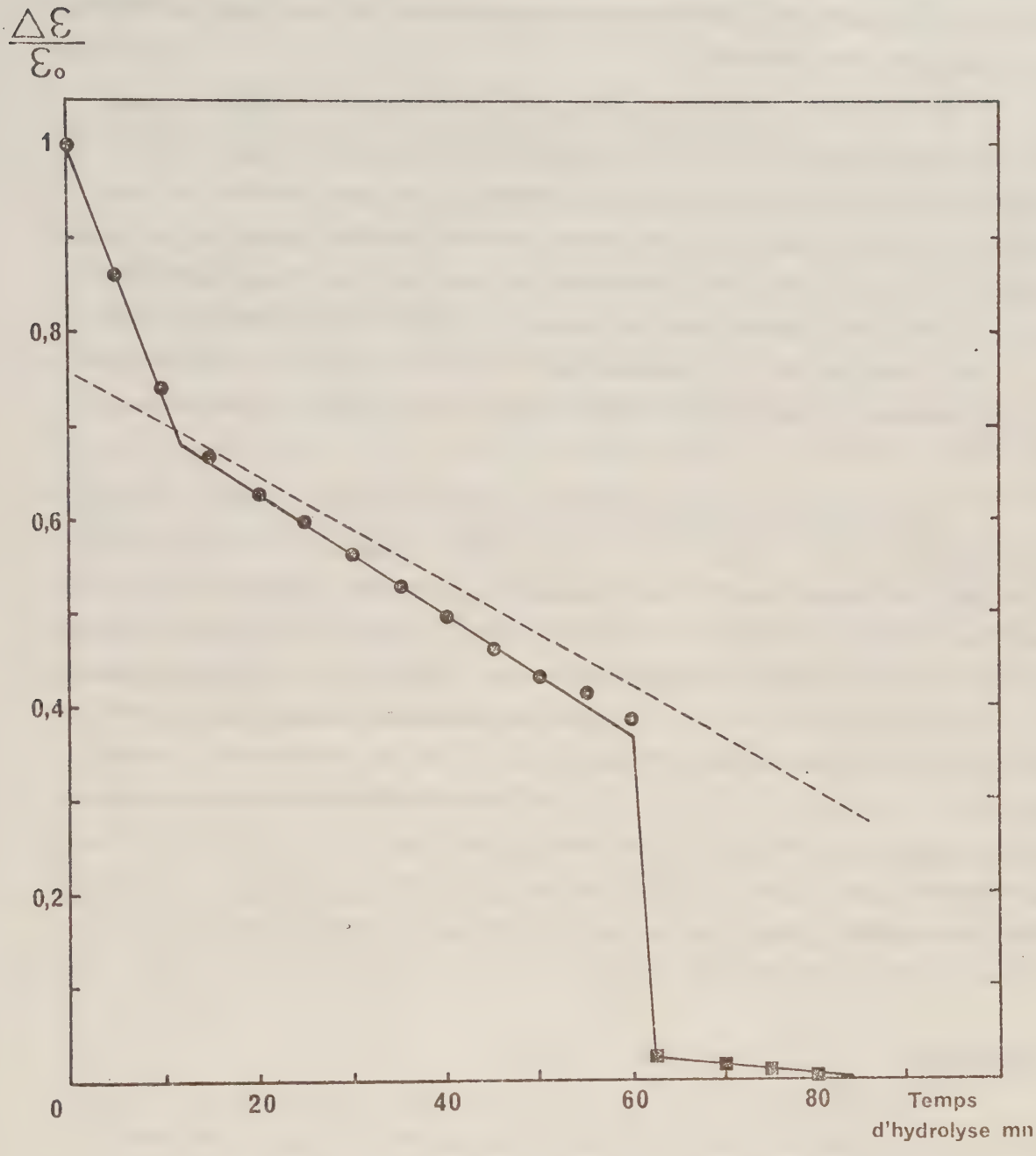


Figure VII_3 : Cinétique d'hydrolyse trypsique du complexe represseur-ADN BrU mesurée par dichroîsme circulaire.

●—●—●: hydrolyse à faible force ionique (KPD 10^{-3}M)

■—■—■: hydrolyse en carbonate d'ammonium 0,1 M à partir de t = 60 mn.

Le tracé (----) reproduit la cinétique d'hydrolyse trypsique, à faible force ionique (KPD 10^{-3}M) des protomères, mesurée lors des expériences d'électrophorèses (cf figure VII_1).

seur non ponté après irradiation. La vitesse d'hydrolyse est également conforme à celle observée en électrophorèse puisque cette phase est terminée après 15 minutes d'expérience.

Nous trouvons ensuite une cinétique d'hydrolyse lente de même nature que celle observée lors de l'expérience précédente (figure VII 3) la légère différence de vitesse pouvant s'expliquer par le fait que dans le premier cas nous observons les protomères non pontés, alors qu'ici nous observons le changement de conformation de l'ADN lors du détachement du répresseur, donc de l'hydrolyse du protomère ponté. Ceci tendrait à démontrer que la cinétique de trypsinolyse est identique pour les quatre protomères et laisserait supposer que ceux-ci sont pareillement protégés par l'ADN.

La troisième phase observée correspond à l'addition de carbonate d'ammonium jusqu'à 0,1 M après 60 minutes d'expérience. Cette addition se traduit par une décomplexation du répresseur, ce qui explique la diminution brutale de l'intensité dichroïque de l'ADN et la modification de la vitesse d'hydrolyse observée en électrophorèse. Pour l'expérience d'électrophorèse, nous constatons toutefois que l'addition de carbonate d'ammonium induit une double cinétique d'hydrolyse (cf figure VII_2), celle ci est tout d'abord rapide puis ensuite plus lente. Cette protéolyse se révèle en outre beaucoup plus longue que celle du répresseur libre, que l'on observe l'hydrolyse des protomères intacts ou l'apparition des protomères trypsinés. Ces observations pourraient s'expliquer en partie par une moindre accessibilité du protomère ponté encore fixé à l'ADN.

D) CONCLUSION

Les expériences que nous venons de décrire montrent que lors des intéractions non-spécifiques, la fixation du répresseur sur l'ADN protège la totalité des "peptides HP" contre l'action de la trypsine.

Ces observations sont elles compatibles avec l'hypothèse des intéractions se faisant par l'intermédiaire de deux protomères seulement ? Pour cela il nous faut admettre que des "peptides HP" n'étant pas en contact avec l'ADN puissent être néanmoins protégés par la présence de celui-ci, soit par encombrement stérique, soit par une stabilisation de la structure générale du répresseur dans une conformation particulière.

Cependant, il nous parait plus vraisemblable de supposer que les quatre "peptides HP" intéragissent avec l'ADN lors de la fixation non-spécifique.

Comment peut-on concilier cette hypothèse avec la présence de deux sites de fixation indépendants sur le répresseur ?

En fait, ces deux résultats ne sont pas forcément incompatibles. Nous pouvons remarquer en effet que les expériences ayant montré la présence de deux sites de fixation ont été effectuées en faisant interagir le répresseur avec des fragments raccourcis tels l'opérateur isolé (O'GORMAN et col., 1980; CULARD et MAURIZOT, 1981), ou des séquences d'ADN non-opérateur de 25 paires de bases obtenues après hydrolyse nucléasique (cf chapitre IV) et que les expériences de DUNAWAY et MATTHEWS (1980) ont montré qu'un répresseur hybride auquel manquent un ou plusieurs "peptides HP" était toujours capable de se complexer avec l'ADN.

Pour expliquer ce résultat, nous pouvons par exemple supposer que le répresseur se fixe "naturellement" sur l'ADN par l'intermédiaire de ses quatre "peptides HP", sans que nous puissions affirmer que ceux-ci interagissent tous de façon équivalente, mais que sa fixation sur l'ADN par l'intermédiaire de deux d'entre eux demeure possible dans certaines conditions expérimentales.

La présence d'un deuxième site de fixation potentiel pourrait par exemple permettre au répresseur de transiter d'une chaîne d'ADN à une autre lors de son glissement le long de la double hélice (BERG et col., 1981; WINTER et VON HIPPEL, 1981 et WINTER et col., 1981).

VIII - ANALYSE DU PEPTIDE PONTE PHOTOCHIMIQUEMENT

A) INTRODUCTION

L'un des buts que nous nous étions fixé en commençant cette étude était l'identification de la région du répresseur pontée photochimiquement à l'ADN BrU. Après avoir montré que le répresseur se pontait à l'ADN BrU par l'intermédiaire de son domaine N-terminal (cf chapitre V), nous avons cherché à affiner cette étude en identifiant le ou les acides aminés impliqués dans le pontage photochimique, ou du moins les peptides trypsiques ou chymotrypsiques comportant ces résidus. Pour mener à bien cette identification, nous avons choisi de procéder par des méthodes enzymatiques.

La première méthode que nous avons utilisé consistait à effectuer une hydrolyse non limitante du répresseur par la trypsine ou la chymotrypsine selon les procédés décrits dans le chapitre V, puis à identifier le peptide ponté par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide du complexe ADN-peptide. Les résultats ainsi obtenus étaient inexploitables du fait de la présence d'ADN qui empêchait une hydrolyse enzymatique complète du répresseur et qui perturbait en outre l'analyse des acides aminés de façon importante.

Pour contourner ces difficultés, diverses méthodes ont été utilisées parmis lesquelles l'emploi d'exopeptidases telles les carboxypeptidases A et Y ou la leucyl-aminopeptidase. Nous avons également cherché à éliminer une partie de l'ADN par dépurination et hydrolyse DNasique. La tentative de pontage du "peptide HP" s'inscrivait également parmi les méthodes envisagées (cf chapitre VI). Toutes ces tentatives n'ont malheureusement pas apporté de solutions au problème posé par la présence de l'ADN et nous avons été contraint de reconsidérer le premier procédé envisagé en y apportant un certain nombre de modifications pour en améliorer les résultats.

Pour imparfaite que cette méthode soit, elle nous a néanmoins permis d'obtenir des informations nouvelles quant à la localisation du site de pontage du répresseur.

B) METHODOLOGIE

Pour cette expérience, nous avons utilisé de fortes concentrations en ADN et en répresseur :

1 répresseur/ 25 p.d.b. { ADN : 3×10^{-4} M en p.d.b. ; Rep. : $1,2 \times 10^{-5}$ M en tétramères

La préparation du complexe ponté ADN BrU-répresseur a été effectuée selon le procédé habituel. Après l'élimination du répresseur non ponté par tamisage moléculaire, le complexe a été dialysé pendant 24 heures contre du tampon carbonate d'ammonium 0,1 M, pH 8, DTE 10^{-4} M.

Les protéolyses ont été effectuées en utilisant la trypsine ou la chymotrypsine, le regroupement des résultats obtenus par l'utilisation de ces deux enzymes devant permettre une analyse plus fine de la région pontée.

Une première protéolyse du complexe a été effectuée à 37°C pendant deux heures avec des concentrations en enzymes de 2 % (m/m). Sitôt l'hydrolyse terminée, les hydrolysats ont été dénaturés à température d'ébullition pendant environ trois minutes puis refoidis brutalement. Cette méthode présente le double avantage de provoquer la précipitation de l'enzyme et du "corps" corespondant et de dénaturer l'ADN. L'accessibilité des sites enzymatiques est ainsi modifiée par la dénaturation thermique de l'ADN BrU et doit permettre une hydrolyse plus complète de la région pontée. Les solutions sont ensuite centrifugées, et le surnageant est hydrolysé à nouveau pendant 4 heures à 37°C puis durant 16 heures à 25°C sous dialyse en utilisant à chaque fois l'enzyme à une concentration de 1 % en masse calculée par rapport à la masse totale des "peptides HP" en solution.

Après hydrolyse, les solutions sont concentrées par évaporation jusqu'à un volume final d'environ 200 µl puis complètées à 500 µl avec du tampon KPD 1 M, KCl 0,5 M. Les solutions sont enfin alcalanisées par addition de soude 5N jusqu'à un pH de 12 ou 13. Les solutions ainsi obtenues sont ensuite injectées sur une colonne de Sephadex G 100 équilibrée avec du tampon triéthylamine 0,1 M, KCl 0,9 M, pH 11. Ce pH et cette force ionique sont destinés à empêcher d'une part une complexation des peptides d'hydrolyse avec l'ADN et d'autre part à réduire l'adsorption de l'ADN sur les parois de la colonne. Ce dernier problème n'a pu être résolu que par l'emploi d'un corps de colonne en plastique polyacrylique (colonne K 9, Pharmacia). Les fractions contenant le complexe ADN-peptide, sont ensuite concentrées jusqu'à un volume de 1 à 2 ml puis dessalées par tamisage moléculaire sur Sephadex G 50 équilibré avec de l'eau bidistillée, le corps de colonne étant là encore en plastique polyacrylique.

Après cette étape, le complexe ADN-peptide est lyophilisé et conservé à -20°C.

L'hydrolyse du complexe est effectuée dans de l'acide chlorhydrique 5,6 N en présence d'un acide aminé témoin de concentration parfaitement connue (10 ou 20 nM de norleucine). Après des hydrolyses de 24 ou 36 heures selon les cas, les solutions hydrolysées sont évaporées et reprises plusieurs fois à l'eau bidistillée. L'hydrolysat est enfin repris dans du tampon citrate de sodium 0,06 M, HCl, pH 2,20 et analysé selon le procédé décrit dans le paragraphe II E 8.

Sachant que l'hydrolyse acide de l'ADN aboutit à la formation d'un grand nombre de produits de dégradation parmi lesquels l'ammoniac, la glycine et la sérine sont en proportions importantes, et voulant tenir compte en outre de possibles phénomènes d'entraînement lors des différentes séparations par tamisage moléculaire, nous avons utilisé comme témoin de l'ADN irradié en présence de répresseur à forte force ionique aux mêmes concentrations que lors de l'expérience de pontage. L'ADN BrU ainsi préparé est traité selon un procédé expérimental scrupuleusement identique à celui décrit ci-dessus pour l'analyse du peptide ponté.

Les concentrations en acides aminés obtenues après analyse sont ensuite normées, soit par rapport à la concentration en ADN mesurée par spectrophotométrie d'absorption après la séparation par tamisage moléculaire sur Sephadex G 50, soit en se basant sur la concentration de glycine mesurée après analyse. Ce résidu constitue en effet avec l'ammoniac le produit essentiel obtenu après hydrolyse acide de l'ADN et la contribution du peptide dans la concentration en glycine mesurée peut être considérée comme négligeable par rapport à celle provenant de la dégradation de l'ADN (< 5 %). La contribution de l'ADN est alors soustraite des résultats de l'analyse du complexe ponté ADN-peptide.

Après ces corrections, nous pouvons constater que les concentrations en phénylalanine sont ramenées à zéro et que la cystéine et le tryptophane sont absents des solutions analysées, or ces résidus sont ceux dont nous pouvons affirmer qu'ils ne peuvent se trouver dans le peptide ponté du fait de leur absence dans le domaine N terminal du répresseur. Ce résultat constitue un bon argument en faveur de la fiabilité de la correction.

C) RESULTATS ET DISCUSSION

Les concentrations en acides aminés déterminées lors de l'analyse ne nous ont pas permis d'identifier directement le ou les peptides pontés à l'ADN. Ceci peut signifier que le répresseur se ponte à l'ADN par l'intermédiaire de plusieurs peptides, ou que les hydrolyses enzymatiques effectuées sont incomplètes. En effet, nous ne pouvons exclure la possibilité que la présence de l'ADN ne diminue l'accessibilité des sites de protéolyse au voisinage du ou des acides aminés pontés photochimiquement. Dans ce cas, seule une analyse fine de chaque expérience peut nous permettre d'identifier le peptide ponté parmi ceux qui ne sont pas libérés par l'hydrolyse enzymatique.

Pour résoudre ce problème, nous avons fait l'hypothèse que dans chaque expérience, la totalité des acides aminés libérés lors de l'hydrolyse était une combinaison linéaire des peptides du domaine N terminal. Etant donné que les trypsinolyses pouvaient être différentes d'une expérience à l'autre car l'avancement de la réaction enzymatique pouvait dépendre du traitement préalable subi (les dénaturations étaient faites aussi semblables que possible, mais l'état final n'étant pas identique, les conditions de l'expérience sont très difficilement reproductibles), chaque expérience a été traitée séparément, une moyenne ne pouvant être faite qu'après examen des résultats et étude de la dispersion.

Le problème consistait donc à décomposer les résultats de chaque expérience sur la base des 6 peptides trypsiques du domaine N terminal, ces 6 peptides étant indépendants, c'est à dire qu'aucun d'eux n'est la combinaison linéaire des autres. Comme le peptide ponté est une combinaison linéaire des 6 peptides trypsiques (cf chapitre V), une décomposition unique doit être obtenue. Mais en raison des incertitudes expérimentales sur la quantité de chaque acide aminé analysé, une solution analytique ne peut être envisagée. Nous avons dû avoir recours à un calcul de régression multiple par la méthode des moindres carrés, calcul effectué grâce à un programme mis en oeuvre et aimablement modifié pour nous par Mr THIERRY, Ingénieur au B.R.G.M. (Orléans).

Comme nous l'avons montré précédemment (cf chapitre V), le pontage s'effectue par l'un des 56 acides aminés N-terminaux du répresseur. Pour avoir une bonne estimation de la fiabilité de notre méthode, nous avons introduit dans le calcul trois peptides supplémentaires, indépendants des six précédants, et non impliqués dans le pontage. Ce sont

REGION N TERMINALE

Peptides trypsiques

1 : Met Lys Pro Val Thr Leu Tyr Asp Val Ala Glu Tyr Ala Gly Val Ser Tyr Gln Thr Val Ser Arg_{22}

2 : Val Val Asn Gln Ala Ser His Val Ser Ala Lys_{33}

3 : Thr Arg_{35}

4 : Glu Lys_{37}

5 : Val Glu Ala Ala Met Ala Glu Leu Asn Tyr Ile Pro Asn Arg_{51}

6 : Val Ala Gln Gln Leu Ala Gly Lys_{59}

Peptides chymotrypsiques

1 : Met Lys Pro Val Thr Leu Tyr_{7}

2 : Asp Val Ala Glu Tyr_{12}

3 : Ala Gly Val Ser Tyr_{17}

4 : Gln Thr Val Ser Arg Val Val Asn Gln_{26}

5 : Ala Ser His Val Ser Ala Lys Thr Arg Glu Lys Val Glu Ala Ala Met Ala Glu Leu Asn Tyr_{47}

6 : Ile Pro Asn Arg Val Ala Gln Gln Leu_{56}

REGION C TERMINALE

Peptides trypsiques

A : Ala Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln Leu Ala Arg_{351}

B : Gln Val Ser Arg_{355}

C : Leu Glu Ser Gly Gln_{360}

Tableau VIII 1

les trois peptides trypsiques C-terminaux comprenant respectivement 11, 4 et 5 acides aminés et ne contenant ni tryptophane, ni phénylalanine, ni cystéine (cf tableau $VIII_1$).

Une telle méthode ne présentait d'intérêt que si nous imposions une contrainte ne permettant que l'obtention de concentrations en peptides positives ou nulles, ces conditions restrictives ont donc été appliquées.

Pour cette analyse, nous avons balayé les fourchettes expérimentales pour chaque acide aminé en prenant comme base la concentration moyenne déterminée pour chacun d'entre eux. Tous les acides aminés ont été analysés à l'exception du tryptophane, de la phénylalanine et de la cystéine (absents), de la proline (sensibilité à la ninhydrine trop faible), de la glycine du fait de la concentration trop importante dans l'hydrolysat du témoin-ADN et de la tyrosine susceptible d'avoir été photodégradée. Du fait de la désamidation de la glutamine et de l'asparagine pendant l'hydrolyse acide amenant la formation des acides glutamiques et aspartiques correspondants, nous sommes donc amené ainsi à résoudre un système surdimensionné de 12 équations à 9 inconnues :

$$AA_1 = a_1p_1 + b_1p_2 + c_1p_3 + \ldots\ldots\ldots + i_1p_9 + \varepsilon_1$$

$$AA_2 = a_2p_1 + b_2p_2 + c_2p_3 + \ldots\ldots\ldots + i_2p_9 + \varepsilon_2$$

$$\vdots \qquad \vdots \qquad \vdots \qquad \vdots \qquad \vdots \qquad \vdots$$

$$AA_{12} = a_{12}p_1 + b_{12}p_2 + c_{12}p_3 + \ldots + i_{12}p_9 + \varepsilon_{12}$$

AA_x = concentration de l'acide aminé x (mesurée)

$a_x, b_x, c_x, \ldots\ldots i_x$ = nombre d'acides aminés x dans le peptide correspondant

ε_x = différence entre les concentrations mesurées et calculées de chaque acide aminé

p_i = concentration en peptide i (inconnue)

On impose $p > 0$, et le calcul de regression est effectué de sorte que $\Sigma\ \varepsilon_x^2$ soit la plus faible possible.

Les résultats des 5 expériences sont regroupés dans le tableau suivant :

Peptides	Résultat des expériences (% en molarité)					Moyenne	% de chaque peptide du domaine N-terminal
	1	2	3	4	5		
1 N-terminal	6,3	4,5	6,7	3,7	4,7	4,8	5
2 N-terminal	30,9	25,1	43,6	32,4	29,5	32,9	34
3 N-terminal	44,2	35,6	11,4	50,8	38,1	36,3	38
4 N-terminal	12,5	8,5	0	0	21,2	8,6	10
5 N-terminal	14,1	14,0	5,2	4,4	15,3	10,6	13
6 N-terminal	0	0	0	0	0	0	0
A C-terminal	3,4	3,4	7,4	5,4	4,5	4,4	-
B C-terminal	0	0	0	24,1	0	4,8	-
C C-terminal	13,5	10,8	11,4	0	0	11,1	-

Tableau $VIII_2$: Evaluation de la proportion de chaque peptide déterminée à partir des concentrations en acides aminés obtenues après analyse (cf tableau $VIII_3$).

L'analyse détaillée des cinq expériences nous permet de faire les constatations suivantes :

- Les peptides les plus abondants sont toujours les peptides 2 et 3, les valeurs mesurées pour ceux-ci étant souvent proches les unes des autres.
- L'hétérogénéité des résultats concernant les peptides 3, 4, B et C peut s'expliquer par le nombre peu élevé d'acides aminés de chacun de ces peptides, les variations de concentration d'un seul résidu suffisant à modifier de façon importante l'évaluation de la concentration de ces peptides. Les 24 % du peptide B C-terminal dans l'expérience 4 s'explique par exemple par des concentrations en valine et en sérine plus élevées que dans les autres expériences et par l'absence de valeur expérimentale pour l'arginine.
- L'analyse des concentrations des 3 peptides C-terminaux non engagés dans le pontage photochimique nous donne une bonne évaluation du bruit de fond obtenu par cette méthode sur l'analyse de peptides plus ou moins longs. Les concentrations mesurées en peptide A (11 résidus) sont constantes mais restent faibles (< 8 %). Pour les peptides B et C plus courts, si la moyenne des valeurs calculées reste faible, les résultats obtenus sont plus dispersés et montrent ainsi la limite de la méthode, où un peptide court peut apparaître très ou très peu abondant uniquement parce qu'il contient un acide aminé dont la valeur expérimentale, peu précise, aura été sur ou sous-évaluée.

Acides aminés	Expérience 1		Expérience 2		Expérience 3		Expérience 4		Expérience 5	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Asx	11,1 ± 3,1	8,8	9,2 ± 1,5	8,4	10,4 ± 2,8	7,9	10,5 ± 6	7,5	14,2 ± 4	9,4
Thr	7,6 ± 2,3	6,7	7,3 ± 2	6,9	4 ± 4	1,7	5 ± 2,5	4,7	4,9 ± 1,8	4,7
Ser	11,6 ± 3,6	10,7	13,1 ± 1,9	11,1	12,5 ± 3,8	16,2	16,9 ± 10	15	10,1 ± 2,1	10,1
Glx	13,6 ± 2	14	13,1 ± 3,1	13,9	14,8 ± 1,9	16	11,3 ± 5,6	11,2	12,2 ± 2	13,2
Ala	16,1 ± 1,8	15,8	15,5 ± 3,4	15,5	15,7 ± 4	16,1	13,6 ± 5	15,1	16,9 ± 4,5	17,4
Val	16,3 ± 2,4	16	15,7 ± 2,2	16,1	11,9 ± 1,7	17,6	19 ± 5	20,7	17,4 ± 1,5	17,3
Met	0,3 ± 0,3	3	0,3 ± 0,3	2,9	2,9 ± 2,9	1,7	5,6 ± 3,1	1,8	2,2 ± 1,5	3,5
Ile	2,1 ± 1,3	2,1	1,4 ± 0,6	1,7	2,7 ± 2,7	0,7	1,2 ± 1,2	0,6	2,8 ± 1,2	2
Leu	5,2 ± 1,4	5,0	4,9 ± 0,7	5,4	4,5 ± 3,1	7,8	3,1 ± 1,9	3,4	5,1 ± 2	4,7
Lys	6 ± 1,1	5,7	5,6 ± 1,1	6,1	5,1 ± 1,8	5,6	-	5,4	8,0 ± 1,6	7,7
His	1,3 ± 1	3,8	1,1 ± 1,1	3,8	1,8 ± 1,8	5,7	-	5	0,9 ± 0,9	3,9
Arg	7,1 ± 0,9	8,3	6,9 ± 1,5	8,3	1,4 ± 1,4	3,2	-	9,1	5,8 ± 2	6,4

Tableau $VIII_3$: Résultats pour chaque expérience des concentrations en acides aminés obtenues lors de l'analyse et des valeurs recalculées à partir de la composition en peptides déterminée.

Colonne A : Concentrations en acides aminés mesurées lors des analyses

Colonne B : Concentrations en acides aminés calculées à partir des concentrations en peptides déterminées (cf tableau $VIII_2$).

Les concentrations, exprimées en nM, sont calculées pour chaque expérience par rapport à la concentration en glycine correspondante rapportée à 100 nM.

Remarques : Les faibles valeurs en méthionine mesurées lors des deux premières expériences sont probablement dues à un dégazage insuffisant des solutions avant l'hydrolyse acide.

L'absence de valeurs pour Lys, His et Arg lors de l'expérience 4 a pour origine des difficultés techniques rencontrées lors de l'analyse.

L'ensemble de ces résultats montre donc qu'une proportion de 10 % trouvée pour un peptide court peut ne pas être significative. La corrélation importante entre les différentes expériences est particulièrement nette si l'on observe les proportions des peptides de plus de 10 acides aminés et l'absence permanente du peptide 6. Ce dernier est en effet le peptide charnière entre le "corps" trypsique et le "peptide HP", et l'interaction directe de ce peptide avec l'ADN peut être considérée comme improbable.

Les faibles concentrations des peptides 1 et A mesurées dans toutes les expériences peuvent s'expliquer par le fait que ces peptides possèdent un nombre important d'acides aminés (11). En effet, dans une telle méthode de calcul, les incertitudes des données expérimentales se traduisent par des ajustements sur la totalité des peptides et particulièrement sur les plus longs comme les peptides 1, 2, 5 (ou A) dont les concentrations apparaissent alors rarement nulles.

Les résultats de ces analyses nous incitent à penser que les peptides 2 ou 3 et peut être dans une moindre proportion le peptide 5 sont impliqués dans le pontage photochimique (cf figure $VIII_4$). Si nous considérons que les concentrations en peptide 3 sont calculées à partir des concentrations de deux acides aminés seulement (arginine et thréonine), la grande dispersion des résultats (12 à 44 %) concernant ce peptide n'est pas surprenante. Mais sa contiguité avec le peptide 2 est peut être simplement la cause de ce phénomène, si la coupure au niveau de la lysine 33 n'est pas complète ou identique d'une expérience à l'autre.

L'observation de la figure $VIII_4$ et du tableau $VIII_2$ montre que le pourcentage de présence du peptide 5 n'est vraiment significatif que lorsque celui du peptide 4 est important. Ceci peut nous conduire à formuler l'hypothèse suivante : Le "peptide HP" n'est en fait facilement hydrolysable par la trypsine dans nos conditions expérimentales qu'en 4 sites : 22 (peptide 1), 35 (peptides 2 et 3), 51 (peptides 4 et 5) et 56 (peptide 6) au niveau des arginines, ceci peut être plus pour des raisons d'ordre stérique que chimique. Si la liaison covalente ADN-protéine se fait au niveau d'un résidu compris entre la valine 13 et l'arginine 35, et si les coupures au niveau des arginines 22 et 35 ne se font plus qu'avec une efficacité respective de 88 et 68 %, nous obtiendrons le profil observé su la figure $VIII_4$. Les proportions observées des peptides 1 et 4-5 peuvent alors n'être dues qu'à une coupure trypsique incomplète.

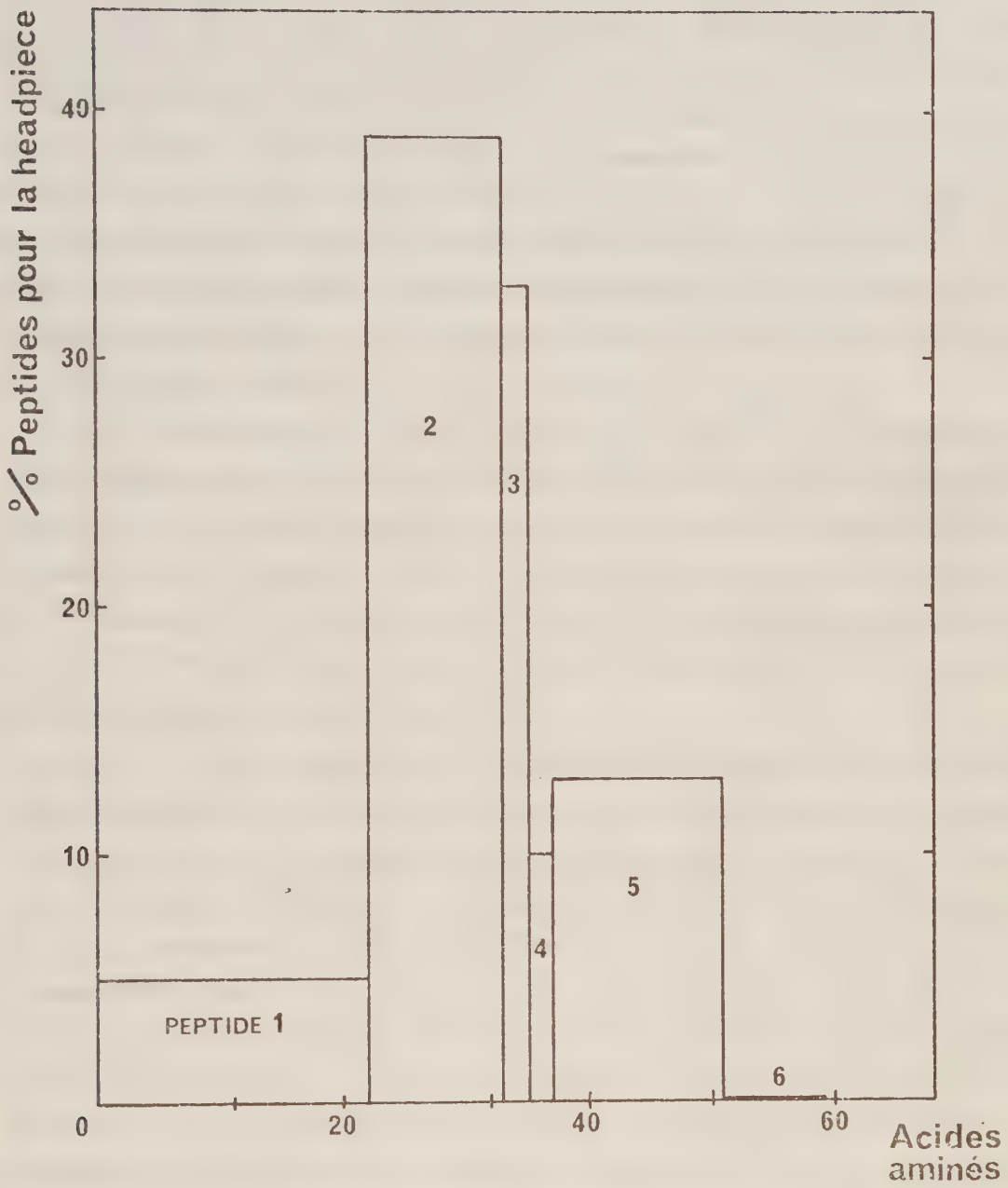


Tableau $VIII_4$: Histogramme exprimant le pourcentage de chaque peptide de la "headpièce" déterminé à partir de la moyenne des expériences effectuées (cf tableau $VIII_2$).

La comparaison (tableau $VIII_3$) des valeurs mesurées pour les acides aminés et des valeurs recalculées à partir des pourcentages de peptides déterminés (tableau $VIII_2$) montre que l'accord est bon pour l'ensemble des acides aminés à l'exception de l'histidine pour laquelle la valeur expérimentale est toujours très inférieure à la valeur recalculée. Pour ce résidu, nous constatons même que la valeur mesurée peut être ramenée à zéro pour la presque totalité des expériences. Cette observation nous amène à faire la remarque suivante : l'histidine a ici le comportement attendu de la part de l'acide aminé qui serait impliqué dans le pontage photochimique. Le pourcentage de peptide 2 est alors vraisemblablement sous estimé, ce qui ne fait que renforcer l'hypothèse précédante.

Nous pouvons en outre remarquer que ce rôle de l'histidine 29 a déjà été mis en évidence dans l'intéraction répresseur-ADN. Elle est, avec la lysine 33, le seul acide aminé du peptide 2 susceptible d'être impliqué dans une liaison éléctrostatique avec l'ADN. Plusieurs auteurs (RIBEIRO et col., 1981; NICK et col., 1982b; SCHNARR, 1982; RUTERJANS, communication personnelle) ont émis l'hypothèse que l'histidine 29 serait protonée lors de l'intéraction avec les acides nucléiques.

Les prévisions de structure basées sur les séquences (BOURGEOIS et col., 1979), laissent supposer que les peptides 2, 3 et 4 pourraient adopter une conformation en hélice α. D'autre part, de récentes études cristallographiques sur le répresseur Cro (ANDERSON et col., 1981 et OHLENDORF et col., 1982), sur la partie N-terminale du répresseur de λ (PABO et MITCHELL, 1982) et la protéine CAP (Mc KAY et STEITZ, 1981 et STEITZ et col., 1982) ont montré que les parties interagissant avec l'ADN adoptaient pour ces protéines une structure en hélice α. Il nous est donc possible de penser que la partie du "peptide HP" en intéraction avec l'ADN pourrait être aussi en hélice α et donc être située dans la région des peptides 2, 3 et 4. Néanmoins, il ne nous est pas possible d'exclure totalement d'autres sites de pontage sur les peptides 1 ou 5 qui seraient beaucoup moins efficaces (9 et 22 %) et qui pourraient également expliquer les résultats expérimentaux obtenus.

Les expériences que nous avons effectué avec la chymotrypsine n'ont pas permis de confirmer ces résultats, l'hydrolyse chymotrypsique est moins complète et les valeurs déduites des deux essais effectués n'étaient pas exploitables.

IX - CONCLUSION GENERALE

Lorsque nous avons commencé ces travaux, notre but était d'apporter notre contribution à l'étude des interactions entre les acides nucléiques et les protéines à l'aide du système de repression de l'opéron lactose. Nos travaux ont porté sur les interactions non-spécifiques entre le represseur et des ADN non-opérateurs.

Pour effectuer cette étude, nous avons choisi de ponter par voie photochimique le represseur à de l'ADN substitué au 5-BrU La première partie de notre travail a consisté à trouver des conditions expérimentales permettant d'induire un maximum de pontages photochimiques entre le represseur et l'ADN substitué et à mettre au point des techniques appropriées à l'étude du complexe.

L'obtention de pontages covalents avec de bons rendements nous a permis d'envisager une étude du represseur engagé dans des interactions non-spécifiques par des méthodes jusqu'ici inappropriées. Deux types d'orientations ont été données à notre étude, d'une part une étude générale du complexe sur la base de travaux déjà éffectués sur le système opérateur-represseur, et d'autre part l'identification de la région pontée avec l'ADN-BrU.

L'étude structurale du complexe ADN-represseur nous a tout d'abord permis de mettre en évidence la présence de deux sites de fixation non-spécifique sur le represseur, et de montrer que les 4 "peptides HP" étaient partiellement protégés contre l'hydrolyse trypsique quand le represseur était complexé à l'ADN non-opérateur. Ces deux résultats tendent tout d'abord à rapprocher les interactions non spécifiques et spécifiques, des résultats analogues ayant été obtenus lors de l'étude du système represseur-opérateur. Les grandes similitudes observées lors de l'étude des interactions spécifiques et non spécifiques semblent accréditer l'hypothèse selon laquelle la totalité de l'ADN interviendrait dans le méchanisme de régulation. La théorie du méchanisme de diffusion du represseur le long de l'ADN, développée par BERG et col. (1981), WINTER et VON HIPPEL (1981) et WINTER et col. (1981), se trouve ici renforcée si l'on admet que la géométrie d'interaction du represseur est sensiblement la même avec les séquences opérateur et non opérateur. Cependant, les résultats de ces deux expériences semblent contradictoires. Le fait que les quatre "peptides HP" soient protégés simultanément par l'ADN semble peu compatible avec la présence de deux sites de fixation opérateur et non-opérateur sur le represseur. Plusieurs

hypothèses peuvent néanmoins être avancées pour expliquer ce résultat. Le fait que les quatre "peptides HP" soient protégés lors de la fixation non spécifique n'implique pas forcément qu'ils soient tous impliqués dans le mécanisme de fixation. Bien que peu probable, cette hypothèse demeure plausible. Nous savons par exemple que de nombreux facteurs tels que la force ionique ou la nature des sels peuvent modifier la stabilité des "peptides HP" et leur résistance au différents enzymes protéolytiques. Il est alors possible de penser que la fixation du répresseur sur l'ADN puisse stabiliser la structure de la protéine dans une conformation particulière diminuant l'accessibilité des sites de coupure protéolytiques. D'autre part, la localisation des "peptides HP" déduite des expériences de diffusion des neutrons (CHARLIER et col., 1981) rend peu vraisemblable l'hypothèse d'un répresseur se complexant à l'ADN par l'intermédiaire des quatre régions N-terminales. Cependant, nos résultats ainsi que ceux de DUNAWAY et MATTHEWS (1980) et NICK et col. (1982), militent plutôt en faveur de l'intéraction simultannée des quatre "peptides HP" avec l'ADN. Si cette hypothèse se révélait exacte, il deviendrait nécessaire d'imaginer un nouveau modèle d'intéraction entre le répresseur et les acides nucléiques qui soit compatible avec ces nouvelles données expérimentales. Dans cette dernière hypothèse, il convient d'expliquer la présence de deux sites de fixation sur le répresseur. Tant pour les intéractions spécifiques que non spécifiques, la mise en évidence du double complexe a été faite sur des fragments d'ADN (opérateur isolé, ADN BrU de 25 paires de bases), c'est à dire sur des séquences que nous pourrions qualifier d'artificielles. Cette observation peut donc seulement signifier que le répresseur possède deux sites possibles d'intéraction avec l'ADN et qu'il pourrait transitoirement, dans des circonstances particulières, se fixer simultanément sur deux brins d'ADN.

Le fait que le "peptide HP" ne puisse se ponter photochimiquement à l'ADN pose quant à lui un certain nombre de questions. Depuis les travaux de PLATT et col. (1972, 1973) qui ont montré que les sites de fixation des inducteurs se trouvaient au niveau du "corps", l'intervention directe ou indirecte de celui-ci dans la fixation spécifique a été soulevée. Le "corps" intéragit-il directement avec l'opérateur, ou impose-t-il une géométrie d'intéraction particulière aux "peptides HP", soit de façon permanente, soit au moment de la fixation des inducteurs ? Pour répondre

à cette question, les complexes avec le répresseur ou le "peptide HP" isolé ont été comparés . Les résultats parfois contradictoires obtenus par ces études n'ont pas permis de trancher entre les différentes hypothèses. L'absence ou la très faible proportion de pontage photochimique du "peptide HP" isolé (cf chapitre VI), ainsi que l'absence de pontage au niveau du "corps" (cf chapitre V), semble montrer que celui-ci intervient pour imposer une géométrie d'intéraction particulière du "peptide HP" vis-à-vis de l'ADN. Une confirmation de cette hypothèse semble être apportée par les expériences d'électrophorèse (cf chapitre VII), les résultats obtenus lors des hydrolyses trypsiques et chymotrypsiques tendent en effet à montrer que lorsque le répresseur est ponté à l'ADN, la mobilité du peptide "charnière" 51-59 entre le "corps" et le "peptide HP" est très réduite. Les sites d'intéraction des deux enzymes sont très proches les uns des autres (trypsine : 51 et 59; chymotrypsine : 56), et les différences d'accessibilité ne peuvent s'expliquer que par une mobilité réduite de cette région qui pourrait trouver son origine dans les contraintes imposées par le "corps" aux régions N-terminales. Si ce résultat limite l'intérêt des travaux effectués sur le "peptide HP" libre, il repose avec un intérêt accru le rôle du "corps" dans la fixation du répresseur avec les acides nucléiques. Neanmoins, malgré ces résultats, nous ne pouvons exclure totalement la possibilité d'une intéraction directe du "corps" avec l'ADN.

L'identification du domaine de pontage du répresseur avec l'ADN BrU s'est faite en deux étapes. Les expériences de tamisage moléculaire et d'électrophorèse (cf chapitre V) ont tout d'abord montré que le pontage photochimique était localisé au niveau de la seule région N-terminale. Compte tenu des difficultés rencontrées lors de l'identification du peptide ponté, ce résultat a présenté un grand intérêt en limitant aux six peptides de la région N-terminale la recherche du peptide impliqué dans le pontage photochimique. Les analyses d'acides aminés (cf chapitre VIII) permettent de supposer que le pontage serait localisé au niveau du peptide trypsique 22-33 et plus probablement au niveau de l'histidine 29 sans que nous puissions écarter la possibilité de pontages en proportions plus faibles sur le peptide 1-21 et plus probablement sur le peptide 38-51. La recherche d'un procédé expérimental facilitant l'analyse des résultats devrait permettre de savoir si ces dernier peptides sont impliqués dans le pontage photochimique.

Le travail que nous avons effectué ne constitue qu'une étape dans la compréhension des intéractions ADN-répresseur, mais il a permis la mise au point de techniques d'études nouvelles pour ce système, devant permettre de mieux appréhender l'ensemble des mécanismes qui régissent les intéractions entre les acides nucléiques et les protéines.

Une étude analogue des intéractions spécifiques devrait permettre de lever un certain nombre d'ambiguités sur le rôle que pourrait avoir le "corps" dans les mécanismes de fixation et sur l'identification des résidus intervenant dans la fixation spécifique. Le nombre important de thymines de la séquence opérateur substituée à la 5-BrdUrd se pontant photochimiquement au répresseur (OGATA et GILBERT, 1977) permet d'espérer par cette méthode l'identification de plusieurs acides aminés du répresseur étant en contact avec l'ADN et permettre ainsi à l'aide des données en notre possession d'apporter des informations sur la structure tridimentionnelle du "peptide HP". Enfin, l'utilisation d'autres ADN substitués à séquences répétitives tels le poly d(A-BrU) pourrait permettre, par l'obtention d'une proportion de pontages plus élevée, de faciliter ces études et de mieux comprendre les intéractions non spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

. Adler, K., Beyreuther, K., Fanning, E., Geisler, N., Gronenborn, B., Klemm, A., Müller-Hill, B., Pfahl, L. et Schmitz, A. (1972) Nature 237, 322-327.

. Alexander, P. et Moroson, H. (1962) Nature 194, 882-883.

. Anderson, W.F., Ohlendorf, D.H., Takeda, Y. et Matthews, B.W. (1981) Nature 290, 754-758.

. Barkley, M.D. (1981) Biochemistry 20, 3833-3842.

. Berg, O.G., Winter, R.B., Von Hippel, P.H. (1981) Biochemistry 20, 6929-6948.

. Beyreuther, K., Adler, K., Geisler, N. et Klemm, A. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3576-3580.

. Beyreuther, K., Adler, K., Fanning, E., Murray, C., Klemm, A. et Geisler, N. (1975) Eur. J. Biochem. 59, 491-509.

. Bourgeois, S. (1971) Methods in Enzymology (L. Grossman et Moldave Eds) 21D, 491-500, Academic Press, New-York.

. Bourgeois, S., Jernigan, R., Szu, S.C., Kabat, E.A. et Wu, T.T. (1979) Biopolymers 18, 2625-2643

. Brun, F., Toulme, J.J. et Helene, C. (1975) Biochemistry 14, 558-563.

. Buck, F., Rüterjans, H. et Beyreuther, K. (1978) FEBS Letters 96, 335-338.

. Buck, F., Rüterjans, H., Kaptein, R. et Beyreuther, K. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5145-5148.

. Budzik,G.P., Lam, S.S.M., Schoemaker, H.J.P. et Schimmel, P.R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4433-4439.

. Butler, A.P., Revzin, A. et Von Hippel, P.H. (1977) Biochemistry 16, 4769-4776.

. Charlier, M., Culard, F., Maurizot, J.C. et Hélène, C. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 690-698.

. Charlier, M., Maurizot, J.C. et Zaccai, G. (1981) J. Mol. Biol. 153, 177-182.

. Culard, F. et Maurizot, J.C. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 5175-5184.

. Culard, F., Schnarr, M. et Maurizot, J.C. (1983) Embo Journal (sous presse).

. De Haseth, P., Lohman, T.M. et Record, M.T. (1977),Biochemistry 17, 4783-4790.

. De Haseth, P.L., Gross, C.A., Burgess, R.R. et Record, M.T.Jr. (1977) Biochemistry 16, 4777-4783.

. Dickson, R.C., Abelson, J., Barnes, W.M. et Reznikoff, W.S. (1975) Science 187, 27-35.

. Dunaway, M. et Matthews, K.S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10120-10127.

. Dunaway, M., Manly, S.P. et Matthews, K.S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7181-7185.

. Durand, M. et Maurizot, J.C. (1980) Biochimie 62, 503-507.

. Ehresmann, B., Reinbolt, J. et Ebel, J.P. (1975) FEBS Letters 58, 106-111.

. Ehresmann, B., Backendorf, C., Ehresmann, C., Millon, R. et Ebel, J.P. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 255-262.

. Farabaugh, P.J. (1978) Nature 274, 765-769.

. Files, J.G., Weber, K. et Miller, J.H. (1974) Proc; Natl. Acad. Sci. USA 71, 667-670.

. Files, J.G. et Weber, K. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3386-3391.

. Fried, M. et Crothers, D. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 6505-6525.

. Ganem, D. Miller, J.H., Files, J.G., Platt, T. et Weber, K. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3165-3169.

. Geisler, N. et Weber, K. (1977) Biochemistry 16, 938-943.

. Geisler, N. et Weber, K. (1978) FEBS Letters 87, 215-218.

. Gilbert, W. et Müller-Hill, B. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1891-1898.

. Gilbert, W. et Maxam, A. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3581-3584.

. Gilbert, W., Gralla, J., Majors, J. et Maxam, A. (1975) Dans "Protein-Ligand Interactions" (Sund, H. et Blauer, G. Eds.) Walter de Gruyter, Berlin, 193-210.

. Gilbert, W., Maxam, A. et Mirzabekov, A. (1976) Dans "Control of Ribosome Synthesis" (Kjeldgaard, N.O. et Maala, O. Eds.) Munksgaard, Copenhagen, 139-148.

. Greer, S. (1960) J. Gen. Microbiol. 22, 618-634.

. Hackett, P. Jr. et Hanawalt, P. (1966) Biochem. Biophys. Acta 123, 356-363.

. Havron, A. et Sperling, J. (1977) Biochemistry 16, 5631-5635.

. Helene, C., Brun, F. et Yaniv, M. (1971) J. Mol. Biol. 58, 349-365.

. Helene, C. et Lancelot, G. (1982) Prog. Biophys. Molec. Biol. 39, 1-68.

. Hewitt, R., Marburger, K. et Lapthisophon, T. (1969) Radiat. Res. 39, 485.

. Hutchinson, F. et Hales, H.B. (1970) J. Mol. Biol. 50, 59-69.

. Hutchinson, F. (1973) Quart. Rev. Biophys. 6, 201-246.

. Jacob, F. et Monod, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 318-356

. Jovin, T.M., Geisler, N. et Weber, K. (1977) Nature 269, 668-672,

. Laiken, S.L., Gross, C.A. et Von Hippel, P.H. (1972) J. Mol. Biol. 66, 143-155.

. Lin, S.Y. et Riggs, A.D. (1972a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2574-2576.

. Lin, S.Y. et Riggs, A.D. (1972b) J. Mol. Biol. 72, 671-690.

. Lin, S.Y. et Riggs, A.D. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7, 947-951.

. Lin, S.Y. et Riggs, A.D. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 704-710.

. Lion, M.B. (1968) Biochem. Biophys. Acta 155, 505-520.

. Lion, M.B. (1970) Biochem. Biophys. Acta 209, 24-33.

. Maly, P., Rinke, J., Ulmer, E., Zweig, C. et Brimacombe, R. (1980) Biochemistry 19, 4179-4188.

. Mandel, C., Schildkraut C.L. et Marmur, J. (1968) Methods in Enzymology Vol. XII Part B, 184-195.

. Matthews, K.S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3348-3353.

. Maurizot, J.C., Charlier, M. et Helene, C. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 951-957.

. Maurizot, J.C. et Charlier, M. (1977) Eur. J. Biochem. 79, 395-399.

. Mc Kay, D.B. et Steitz, T.A. (1981) Nature 290, 744-749.

. Mc Kay, D.B., Pickover, C.A. et Steitz, T.A. (1982) J. Mol. Biol. 156, 175-183.

. Miller, J.H., Coulondre, C., Schmeissner, U., Schmitz, A. et Lu, P. (1975) Dans "Protein-Ligand Interactions" (Sund, H. et Blauer, G. eds.) Walter de Gruyter, Berlin, 238-252.

. Möller, K., Zweib, C. et Brimacombe, R. (1978) J. Mol. Biol. 126, 489-506.

. Müller-Hill, B., Capro, L. et Gilbert, W. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 1259-1264.

. Müller-Hill, B. (1975) Prog. Biophys. Mol. Biol. 30, 227-252.

. Nick, H., Arndt, K.T., Boschelli, F., Jarema, M.A., Lillis, M., Sommer, H., Lu, P. et Sadler, J. (1982a) J. Mol. Biol. 161, 417-438.

. Nick, H., Arndt, K.T., Boschelli, F., Jarema, M.A., Lillis, M., Sadler, J., Caruthers, M. et Lu, P. (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 218-222.

. Ogata, R.T. et Gilbert, W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4973-4976.

. Ogata, R.T. et Gilbert, W. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5851-5854.

. Ogata, R.T. et Gilbert, W. (1979) J. Mol.Biol. 132, 709-728.

. O'Gorman, R., Dunaway, M. et Matthews, K.S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10100-10106.

. Ohlendorf, D.H., Anderson, W.F., Fischer, R.G., Takeda, Y. et Matthews, B.W. (1982) Nature 298, 718-723.

. Pabo, C.O., Kravatin, W., Jeffrey, A. et Saler, R.T. (1982) Nature 298, 441-451.

. Pfahl, M.,Stockter,C. et Gronenborn, B. (1974) Genetics 76, 669-679.

. Pfahl, M., Gulde, V. et Bourgeois, S. (1979) J. Mol. Biol. 127, 339-344.

. Platt, T., Weber, K., Ganem, D. et Miller, J.H. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 896-901.

. Platt, T., Files, J.G. et Weber, K. (1973) J. Biol. Chem. 248, 110-121.

. Revzin, A. et Von Hippel, P.H. (1977) Biochemistry 16, 4769-4776.

. Ribeiro, A.A., Wemmer, D., Bray, R.P. et Jardetzky, O. (1981) Biochemistry 20, 813-823.

. Riggs, A.D., Susuky, H. et Bourgeois, S. (1970a) J. Mol. Biol. 48, 67-83.

. Riggs, A.D., Bourgeois, S. et Cohn, M. (1970b) J. Mol. Biol. 53, 401-417.

. Rosenberg, J.M., Khallai, O.B., Kopka, M.L., Dickerson, R.E. et Riggs A.D. (1977) Nucleic acids Res. 4, 567-572.

. Schimmel, P.R. (1979) Dans "Advance in Enzymology and related areas of Molecular Biology" (Meister, A. Ed.) Wiley, J. and sons, 187-222.

. Schnarr, M. (1982) These d'état, Orleans

. Schoemaker, H.J.P., Budzik, G.P., Giege, R. et Schimmel, P.R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4440-4444.

. Setlow, R.B. et Setlow, J.K.(1972)Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1,293-346

. Smith, K.C. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 157-163.

. Steitz, T.A., Richmond, T.J., Wise, D. et Engelman, D. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 593-597.

. Steitz, T.A., Ohlendorf, D.H., Mc. Kay, D.B., Anderson, W.F. et Matthews, B.W. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3097-3100.

. Stephan, G., Miltenburger, H.G. et Holtz, G. (1970) Z. Naturforsch B. 25, 1037-1042.

. Szybalsky, W. et Szybalsky E.H. (1971) Proc. in Nucleic Acid Research 2, 311-354.

. Tse, Y.C., Kirkegaard, K et Wang, J.C. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5560-5565.

. Von Hippel, P.H., Revzin, A., Gross, C.A. et Wang, A.C. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4808-4812.

. Wade-Jardetzky, N., Bray, R.P., Conover, W.W., Jardetzky, O., Geisler, N. et Weber, K. (1979) J. Mol. Biol. 128, 259-264.

. Wang, S.Y. (1976) Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids (Academic Press Inc. Vol I), 295-356.

. Wang, A.C., Revzin, A., Butler, A.P. et Von Hippel, P.H. (1977) Nucleic Acid Res. 4, 1579-1593.

. Weber, K. et Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

. Weber, K., Files, J.G., Platt, T., Ganem, D. et Miller, J.H. (1975) Dans "Protein-Ligand Interactions" (Sund, H. et Blauer, G. Eds.) Walter de Gruyter, Berlin, 228-237.

. Weintraub, H. (1973) Cold Spring Harbor Symposium, Quant. Biol. 38, 247-256.

. Weygand, F., Wacker, A. et Grisebach, H. (1951) Z. Naturforsch B. 6, 177- 178

. Weygand, F., Wacker, A. et Motiram, K. (1956) Chem. Ber. 89, 475- 480.

. Winter, R.B., Berg, O.G. et Von Hippel, P.H. (1981) Biochemistry 20, 6961-6977.

. Winter, R.B. et Von Hippel, P.H. (1981) Biochemistry 20, 6948-6990.

BARBIER Bernard

Thèse de Doctorat de 3ème Cycle - PARIS VI - 1982

Mots-clés

Répresseur opéron lactose - Intéractions protéines-acides nucléiques
Pontage photochimique - Structure des protéines.

Résumé

Les intéractions du répresseur de l'opéron lactose avec des séquences non-opérateur ont été étudiées en pontant photochimiquement le répresseur à de l'ADN d'*E. coli* substitué au 5-BrU. Après l'obtention de pontages covalents, nous avons pu mettre en évidence la présence de deux sites de fixation non spécifiques sur le répresseur. L'absence de pontage photochimique entre le domaine N-terminal du répresseur (peptide HP) et l'ADN BrU semble montrer que le "corps" trypsique intervient pour modifier la géométrie d'intéraction du "peptide HP" vis-à-vis de l'ADN. Les analyses effectuées sur la région pontée photochimiquement nous permettent de supposer que la majeure partie des pontages se situerait au niveau du peptide 22-33 et probablement au niveau de l'histidine 29.